

Libros de **Cátedra**

Elementos de genética

Para estudiantes de Ciencias Biológicas

Cecilia I. Catanesi y Egle E. Villegas Castagnasso
(coordinadoras)

n
naturales

FACULTAD DE
CIENCIAS NATURALES Y MUSEO


EDITORIAL DE LA UNLP



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

ELEMENTOS DE GENÉTICA
PARA ESTUDIANTES DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Cecilia I. Catanesi
Egle E. Villegas Castagnasso
(coordinadoras)

Facultad de Ciencias Naturales y Museo



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA


EDITORIAL DE LA UNLP

A mi familia materna por inculcarme el amor por la docencia, a mi compañero de vida, Alfredo, por ser mi sostén siempre y a mis hijos Auca e Inan por ser el motor que me impulsa.

Egle E. Villegas Castagnasso

A mi mamá que amorosamente me enseñó casi todo en la vida, a mi marido Marcelo que me nutre de energía, y a mis dos hijos, Ignacio e Iván, que son lo mejor de mi existencia.

Cecilia I. Catanesi

Agradecimientos

En primer lugar agradecemos al Dr. Alejandro del Palacio porque sin su tenacidad y su apoyo no hubiéramos siquiera encarado este proyecto.

A la Lic. Melisa Mantella por estar permanentemente dispuesta a dar una mano auxiliadora.

A los autores de cada uno de los capítulos que componen este libro, porque sin el compromiso y la dedicación de todos ellos no hubiéramos podido realizarlo.

A la Cátedra de Citología de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la UNLP por la gentileza de cedernos material fotográfico.

A los estudiantes de cada año, que a través de sus consultas, sus inquietudes y apertura al diálogo nos han enseñado muchísimo en nuestra tarea docente.

Finalmente, agradecer al equipo de la Colección Libros Cátedra de la UNLP por el acompañamiento en la edición de este libro.

Índice

Capítulo 1

Genes, cromosomas y herencia. La transmisión de la información genética.....	9
El ADN y el ARN: las moléculas de la vida	10
Genes y genomas	11
Genoma extranuclear	13
Los cromosomas y la “RTT” (replicación, transcripción y traducción)	13
El Código Genético.....	17
Algunos conceptos sobre Herencia Mendeliana.....	18
Herencia ligada al sexo	21
Ampliaciones de la Genética Mendeliana	22
Variaciones de la dominancia.....	22
Genes ligados.....	23
Ejercicios	24
Referencias	26

Capítulo 2

Regulación de la Expresión Génica	27
Regulación de la expresión génica en Procariotas	27
Operón Lactosa	29
Operón triptófano.....	30
Regulación de la expresión génica en Eucariotas	32
Condensación de la cromatina	33
Metilación del ADN	34
Nivel transcripcional.....	34
Nivel post-transcripcional	36
Nivel traduccional	39
Nivel post-traduccional	41
Comparación de la regulación génica en Procariotas y Eucariotas	41

Ejercicios	42
Referencias	46

Capítulo 3

Introducción a la Citogenética	48
Estructura, función y comportamiento cromosómico	48
Un poco de historia	48
Cromatina y Cromosomas.....	50
Cromosoma: Estructura y función	52
Cariotipo	54
Idiograma.....	55
Bandeo cromosómico	56
Cromosomas politénicos	56
Cromosomas plumosos.....	58
Alteraciones del material genético	59
Cambios cromosómicos numéricos.....	60
Cambios cromosómicos estructurales.....	62
Mecanismos de determinación sexual	65
Ejercicios	67
Referencias	68

Capítulo 4

Citogenética Aplicada.....	69
La citogenética en el estudio evolutivo y aplicado del maíz y sus especies relacionadas	69
Análisis del cariotipo	69
Contenido de ADN. Variación del tamaño del genoma.....	70
Bandeo cromosómico con fluorocromos	71
Análisis del comportamiento meiótico	72
Citogenética molecular	72
Aplicación de la técnica de FISH para la identificación de aberraciones cromosómicas que involucran secuencias teloméricas	75
Tipos de sondas para FISH. Las sondas "PNA"	75
Telómeros y secuencias teloméricas intersticiales (STI)	76
Detección de secuencias teloméricas en los cromosomas de vertebrados y su utilidad para evaluar el daño cromosómico inducido por un mutágeno	78
Aplicabilidad de la técnica de FISH con sonda pantelomérica: conclusiones	82
Caracterización citogenética en primates en cautiverio.....	83
Aspectos generales	83

El caso del género <i>Saimiri</i>	84
Sistemas cromosómicos de determinación sexual y estudios meióticos.....	86
Referencias	88

Capítulo 5

Marcadores Genéticos: Introducción al análisis y su aplicación en diversas áreas biológicas .	90
Marcadores Genéticos: Un poco de historia	90
Marcadores moleculares	92
Acerca de su localización	92
Algunas técnicas empleadas en el análisis de marcadores moleculares	93
Algunas metodologías empleadas en la genotipificación de marcadores moleculares.....	97
Marcadores moleculares: algunas aplicaciones.....	103
Ejercicios	105
Referencias	108

Capítulo 6

Genética de poblaciones.....	109
Frecuencias alélicas y genotípicas.....	109
Ley de Hardy-Weinberg.....	110
Procesos Microevolutivos.....	114
Mutación	114
Selección natural	116
Selección artificial	121
Deriva génica.....	121
Flujo genético	123
Ligamiento y recombinación.....	126
Ejercicios	127
Referencias	132

Capítulo 7

Bioética y legislación sobre genética en Argentina.....	133
Investigación genética en seres humanos	133
Comités de ética y comunidades vulnerables	134
Bancos de material genético	136
Diagnóstico Genético.....	137
Farmacogenética.....	138
Confidencialidad de la información genética.....	139

Modificaciones genéticas	139
Terapia génica y edición de genes	140
Organismos Modificados Genéticamente (OMG)	141
Patentes.....	142
Clonación en animales: el problema de las mascotas	142
Clonado de especies extintas.....	144
Clonación humana.....	144
Investigación genética en animales	145
Diversidad genética y ambientes naturales	148
Cuestionario	148
Referencias	148
Capítulo 8	
Protocolos de trabajo de laboratorio	151
<i>Drosophila melanogaster</i> como modelo de estudio	151
Ciclo de vida	153
Medio de cultivo y técnica de observación	155
Dimorfismo sexual y obtención de hembras vírgenes.....	156
Extracción y Purificación de ADN.....	157
Colecta del Material	158
Extracción de ADN	160
Precipitación y cuantificación del ADN	161
Protocolos de Laboratorio	162
PCR.....	164
Protocolo de amplificación.....	165
Electroforesis.....	166
Protocolo para electroforesis de ADN en gel de agarosa	169
Referencias	169
Glosario	171
Los autores	175

CAPÍTULO 1

Genes, cromosomas y herencia. La transmisión de la información genética

M. Fernanda Alvarez, Anabela Mira y M. Luciana Villaverde

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es conocido como la molécula de la herencia y es la que contiene la información necesaria para la generación de todos los organismos vivos. Su descubrimiento, estudios y aplicaciones permitieron el salto a una nueva era, la era del ADN o de la Genómica.

El ADN fue aislado por primera vez por el biólogo suizo Friedrich Miescher en el año 1869, quien describió una sustancia rica en fosfatos, sin azufre y resistente a proteasas, con propiedades que no se corresponden con lípidos ni proteínas. A esta nueva molécula, presente en todos los núcleos celulares, se la llamó **nucleína**, y posteriormente se le asignó el nombre genérico de ácido nucleico.

Unos años antes, en 1843, el monje austríaco Gregor Mendel empezaba a estudiar la herencia, cuando todavía no se sabía de la existencia de los cromosomas, pero sí se observaba que las características pasaban de padres a hijos y que la determinación de las mismas estaba dada gracias a "factores". Años más tarde, algunos científicos redescubrieron los trabajos de Mendel, por mucho tiempo ignorados, y evaluaron este modelo en términos del comportamiento de los cromosomas. Fue a principios del siglo XX cuando comenzaron a realizarse las primeras vinculaciones entre la ubicación de los genes en sitios específicos en los cromosomas, la meiosis y la herencia de los genes; compilándose luego la **teoría cromosómica de la herencia**.

En la década de 1920 Phoebus Levene determinó la composición de la nucleína, que incentivó posteriores investigaciones como las de Oswald Theodore Avery y su colaborador Maclyn McCarty, quienes en 1944, determinaron que el ADN es el material que contiene la información genética y forma parte de los cromosomas. Anteriormente las proteínas eran consideradas como moléculas de la herencia, pero más tarde se comprobó que el ADN es la molécula responsable de la misma. Años después, Francis Crick y James Watson tomaron los datos antes hallados por Rosalind Franklin y Maurice Wilkins (estudio de difracción por rayos X del ADN) y Erwin Chargaff (determinó las proporciones de bases nitrogenadas en el ADN) y, sumando los hallazgos propios, lograron dilucidar la estructura molecular de doble hélice del ADN. Por ello, en 1962 Watson, Crick y Wilkins recibieron el premio Nobel.

Ya en el siglo XXI, los avances en la tecnología aplicada al estudio del ADN, específicamente en los métodos de secuenciación, condujeron al conocimiento de la información genética de

una gran variedad de organismos, como el ser humano, el maíz y el ratón, posibilitando enormes avances en disciplinas tan diversas como la biomedicina, la paleontología, la agricultura y la medicina forense, entre otras.

El ADN y el ARN: las moléculas de la vida

El ADN es el material genético que compone el **genoma** de todas las formas de vida celular, mientras que algunos virus tienen genomas de ácido ribonucleico (ARN). Los ácidos nucleicos son macromoléculas poliméricas lineales, no ramificadas, formadas por cadenas de subunidades monoméricas que forman los **cromosomas**, los cuales están contenidos en el citoplasma de las células procariotas y en el núcleo de las células eucarióticas, sus mitocondrias y cloroplastos. Es en ellos donde se encuentra codificada la información genética de los organismos.

La molécula de ADN está formada por dos cadenas antiparalelas que se encuentran enrolladas alrededor de un eje central formando una doble hélice, mientras que la molécula de ARN generalmente se encuentra como cadena simple (Figura 1.1). Cada **nucleótido** está formado por tres componentes, recibiendo su denominación acorde a la base nitrogenada que lo compone:

- Base nitrogenada (adenina, citosina, timina, guanina y uracilo)
- Azúcar pentosa (ribosa o desoxirribosa)
- Grupo fosfato

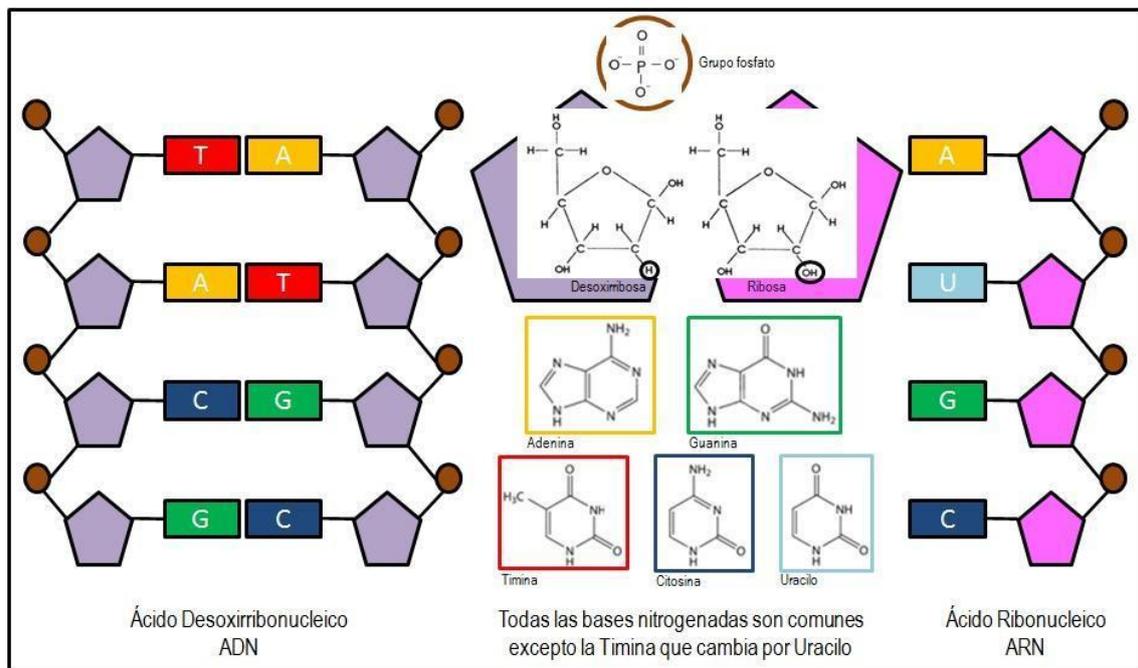


Figura 1.1. Estructura de los nucleótidos de ADN y ARN.

Genes y genomas

Como vimos previamente, la información genética de los organismos se encuentra codificada en las moléculas del ADN, cuya totalidad constituye el **genoma** de una especie en particular. El número de moléculas que posee cada organismo está en relación con el número de cromosomas que presenta cada especie, donde cada cromosoma está conformado por una única molécula de ADN. En los **organismos procariontes**, los genomas están formados casi totalmente por información que codifica productos finales. El cromosoma procarionte es una única molécula de ADN casi siempre circular, contenida en una región definida del citoplasma denominada nucleoide, sin estar separada del mismo por una membrana.

Por el contrario, en los organismos eucariotas la composición del genoma es más compleja, por ejemplo el genoma humano está constituido por aproximadamente 30.000 genes y en general cada célula del cuerpo contiene dos copias de cada uno de esos genes. En ellos están los códigos químicos con la información que controla y regula cómo funciona el cuerpo, cómo está constituido, qué aspecto tiene, la especificidad de los órganos y los tejidos. Un **gen** consiste en una secuencia específica de bases, es decir un segmento de ADN, que cuenta con elementos regulatorios y la información necesaria para determinar una cadena polipeptídica. En cada cromosoma de una especie, cada gen se presenta en un lugar determinado al que se denomina **locus** (en plural, **loci**). Estos genes pueden presentar variaciones, dando lugar a la existencia de formas alternativas o **alelos**. Si en un organismo diploide los alelos presentes para un gen o un locus determinado son iguales, lo denominamos **homocigota** y si los alelos son diferentes será **heterocigota** (Figura 1.2).

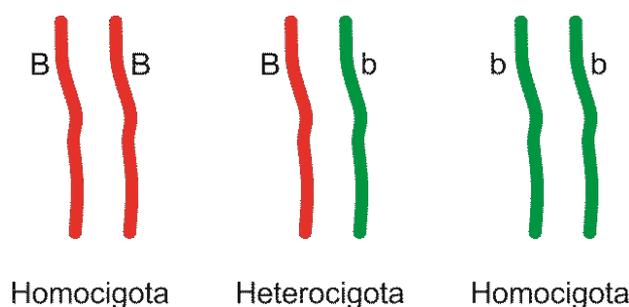


Figura 1.2. Un organismo diploide posee dos alelos (o variantes) para un locus (o lugar específico) en ambos cromosomas homólogos.

La composición del genoma eucariota es compleja, diferenciándose las distintas secuencias según su función. Por un lado, las moléculas de ADN están compuestas por secuencias que determinan la formación de proteínas o de diferentes ARNs; al conjunto de estas secuencias se lo denomina **ADN codificante**. El resto del ADN, que representa el mayor porcentaje, que en algunas especies puede ser más del 90%, está formado por secuencias no codificantes cuya función puede ser regulatoria, estructural o cumplir otras funciones que aún se desconocen (Tabla 1.1).

Tabla 1.1: Tamaño relativo del genoma y número de genes estimado en distintas especies

Especie	Tamaño del genoma (Mb)	Número de genes
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (bacteria)	2.2	2300
<i>Escherichia coli</i> (bacteria coliforme)	4.6	4400
<i>Euglena gracilis</i> (flagelado unicelular)	1.4	128
<i>Caenorhabditis elegans</i> (gusano nematode)	97	19000
<i>Drosophila melanogaster</i> (mosca de la fruta)	180	13700
<i>Oryza sativa</i> (arroz)	466	45000-55000
<i>Mus musculus</i> (ratón)	2500	29000
<i>Homo sapiens</i>	2900	30000

Fuente: Watson et al. (2004) y GenBank

Los genomas de las distintas especies presentan distintos tamaños. Se ha observado que esta variación no está relacionada con el nivel evolutivo, sino con la proporción de secuencias codificantes y no codificantes de los distintos grupos. Las bacterias contienen una molécula de ADN corta, generalmente circular y relativamente exenta de proteínas. Por su parte, las células eucariotas contienen mayores cantidades de ADN, que se encuentra organizado de manera compacta para formar las fibras de cromatina. Este incremento en complejidad está relacionado con el aumento de la información genética presente y con la mayor complejidad asociada a sus funciones genéticas. Una simplificación de las distintas secuencias que conforman un genoma eucariota se muestra en la siguiente figura. 1.3.

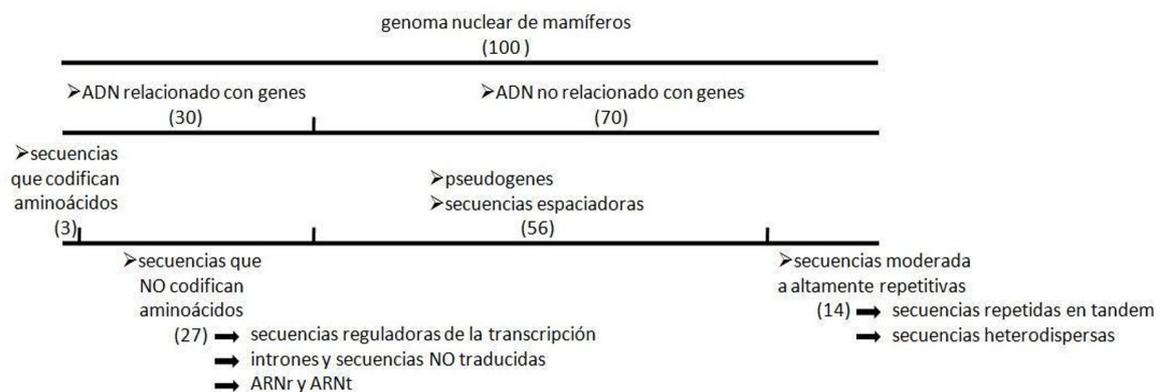


Figura 1.3. Distintas secuencias que conforman un genoma de mamíferos.

Las secuencias que no forman parte de los genes ocupan distintas regiones que pueden presentarse una sola vez o tener repeticiones, pudiendo estas últimas disponerse de manera contigua una de la otra (en tándem) o estar dispersas por el genoma. Al igual que la relación entre las se-

cuencias codificantes y no codificantes, el tamaño del genoma es muy variable entre especies, sin correlación con el grado de complejidad biológica (paradoja del valor C) (Figura 1.4).

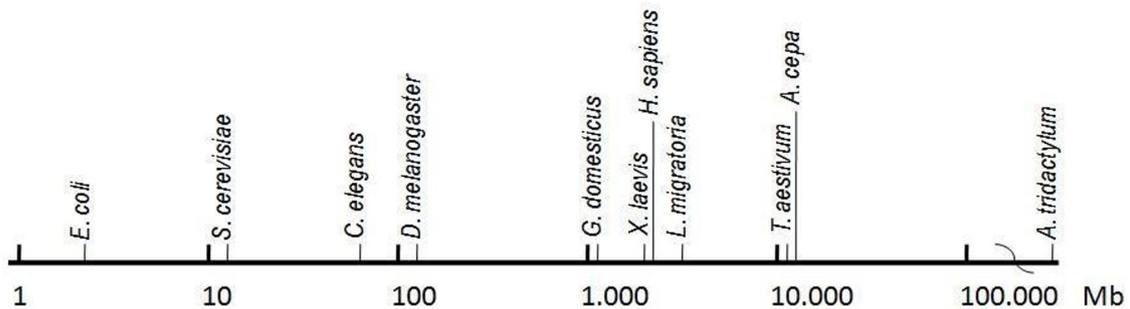


Figura 1.4: Tamaño del genoma de diferentes seres vivos. De izquierda a derecha: *Escherichia coli* (bacteria), *Saccharomyces cerevisiae* (hongo), *Caenorhabditis elegans* (nematode), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), *Gallus domesticus* (gallina), *Xenopus laevis* (anuro), *Homo sapiens* (humano), *Locusta migratoria* (langosta), *Triticum aestivum* (trigo), *Allium cepa* (cebolla), *Amphiuma tridactylum* (salamandra)

Genoma extranuclear

Denominamos genoma extranuclear o **genes no-mendelianos** al ADN que está ubicado fuera del núcleo, presente en las mitocondrias de animales y vegetales y en los cloroplastos de estos últimos. Estas organelas poseen su propio ADN, el cual es transcrito y traducido dentro de ellas. Este material genético es generalmente de origen materno, ya que el citoplasma celular de una cigota procede del gameto femenino, por esta razón se dice que su herencia no es mendeliana.

La estructura tanto del genoma mitocondrial como de los cloroplastos es muy similar. Ambos presentan ADN circular (recuerdan al ADN bacteriano), dispuesto como una doble hélice superenrollada, cerrada y sin extremos. El ADNmt (ADN mitocondrial) fue descubierto en 1963 y tiene un tamaño reducido, en humanos con aproximadamente 16.569 pares de bases, conteniendo 37 genes que codifican ARN ribosómico y ARN de transferencia, además de las proteínas que participan en la fosforilación oxidativa. En tanto que el ADNcp (ADN de cloroplastos) es más grande, con un tamaño que varía entre 80 y 600 kb. Todos los genomas de los cloroplastos que se conocen hasta ahora tienen una proporción muy alta de ADN no codificante, y además alojan los genes que codifican las proteínas de los ribosomas, las subunidades de la ARN polimerasa y otras proteínas necesarias para la fotosíntesis.

Los cromosomas y la “RTT” (replicación, transcripción y traducción)

Los cromosomas son las estructuras donde están contenidos los genes y son los responsables de la transmisión de la información genética. Cada cromosoma es una cadena de ADN, asociada a otras proteínas y super condensada formando una estructura característica que

observamos durante la metafase (Figura.1.5). Cabe mencionar que durante la mayor parte del ciclo celular el ADN no está condensado, sino en forma laxa y solamente adquiere la configuración “compacta” al momento de la división celular.

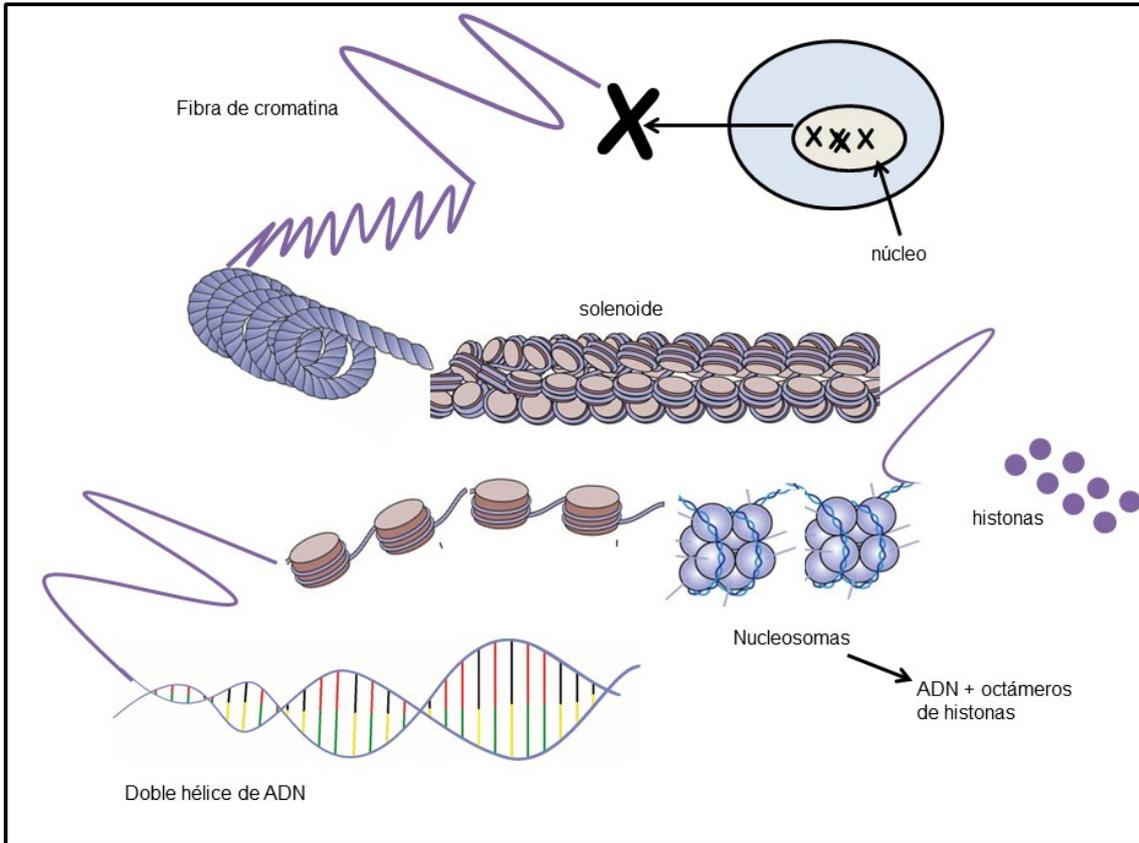


Figura 1.5. Modelo general de asociación entre histonas y ADN para formar desde el nucleosoma, hasta finalmente conformar el cromosoma metafásico.

En los organismos que presentan reproducción asexual, los hijos son idénticos a los padres puesto que son producidos como resultado de la división celular por mitosis. Como consecuencia, la descendencia tiene las mismas ventajas y desventajas que los padres para sobrevivir en el medio, es decir, no se produce variabilidad genética. La duplicación de la célula va precedida por la replicación de los cromosomas. Cuando las células que se originan comienzan a separarse, también lo hacen los cromosomas replicados. Luego de la separación, quedan como resultado dos células de idéntica composición genética (excepto por la posibilidad de una mutación espontánea).

En los organismos de reproducción sexual, la transmisión de la información genética de una generación a la siguiente se realiza mediante la producción de gametas, generadas a través del proceso de meiosis. En animales y plantas superiores, una célula diploide genera cuatro células haploides que formarán las células sexuales o gametas (Figura 1.6).

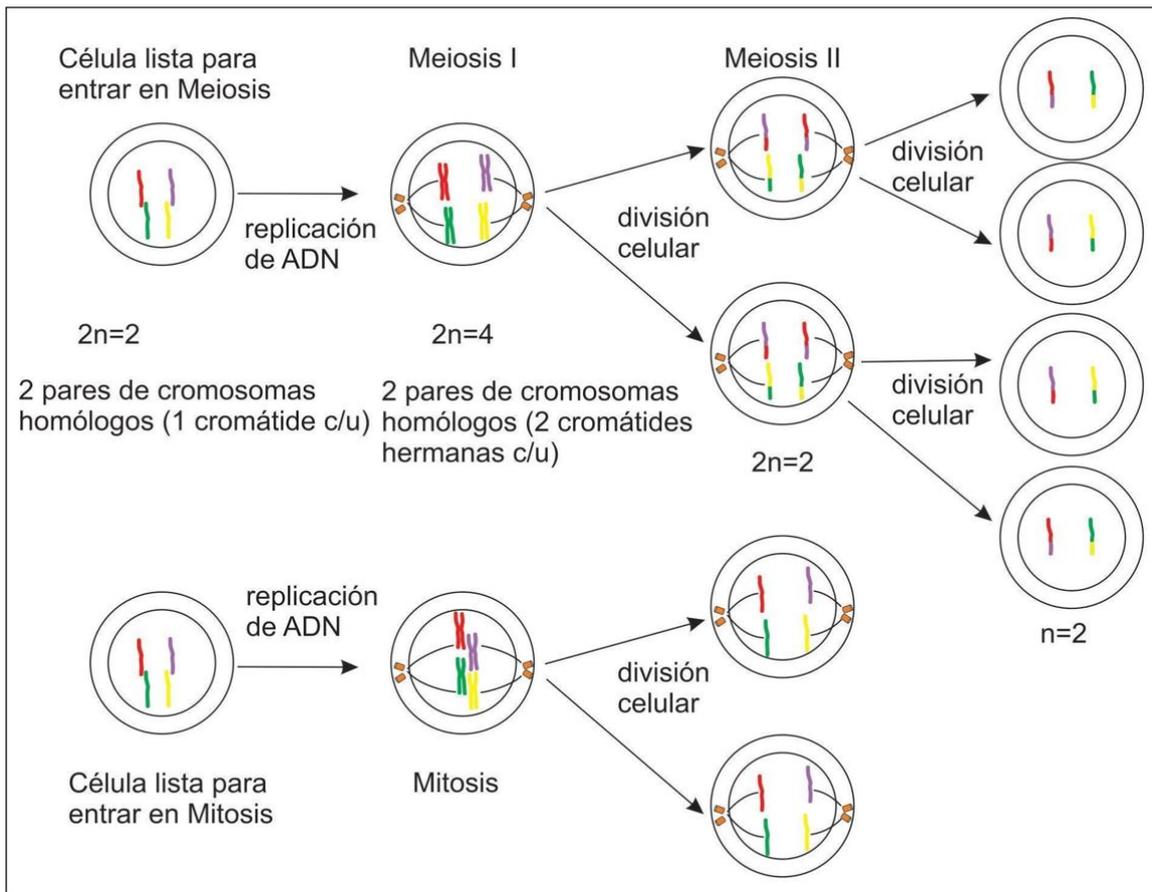


Figura 1.6. Principales sucesos y resultados en la meiosis y mitosis.

Para que pueda llevarse adelante el pasaje de la información entre las células progenitoras y sus descendientes, indefectiblemente el material genético (los cromosomas) debe replicarse. La replicación del ADN se produce de manera **semiconservativa**, donde cada cadena de la doble hélice progenitora sirve de molde para la producción de una nueva hebra que se forma por complementariedad de las bases. La cadena de ADN recién sintetizada queda conformada por una cadena vieja y una cadena nueva. Este proceso consta de tres etapas: iniciación, elongación y terminación y se basa en el apareamiento de bases entre nucleótidos complementarios.

La replicación en procariontes y eucariotes se desarrolla de manera similar, guardando relación con la distinta complejidad de los organismos. En los procariontes la replicación tiene un solo punto de inicio (Ori C) y la realiza una enzima ADN polimerasa particular, mientras que en los eucariotes existen múltiples orígenes de replicación, como así también múltiples formas de ADN polimerasas, y la replicación de los extremos (telómeros) de las moléculas lineales de ADN es llevada a cabo por una enzima especial denominada telomerasa.

La transcripción es el proceso a través del cual la información codificada en el ADN se transcribe a ARN. Cuando se inicia la transcripción, parte de la doble hélice de ADN se abre y se desenrolla en sitios específicos. Una de las hebras de ADN desenrollada actúa como un molde a partir del que se formará una hebra complementaria de ARN. Esta hebra complemen-

taria de ARN se denomina ARN mensajero (**ARNm**). En eucariotas, el ARNm se separa del ADN, abandona el núcleo, luego de sufrir un proceso de maduración, y se traslada hasta el citoplasma de la célula. Aquí el ARNm se adhiere a un ribosoma, donde se produce la síntesis de la proteína (Traducción).

El inicio de la transcripción depende de una región corriente arriba (hacia el extremo 5' del ADN) denominada promotor, que representa el sitio de unión a la ARN polimerasa. Los promotores contienen secuencias específicas de ADN (por ejemplo la caja TATA) que son esenciales para el reconocimiento y la unión de esta enzima. Al igual que la replicación, la transcripción es más compleja en eucariotas que en procariotas, ya que requiere la participación de factores de transcripción para su efectivo desarrollo. A su vez, el transcripto primario eucariótico es un pre-ARNm que debe modificarse de diversas maneras antes de traducirse. Este procesamiento incluye la adición de una caperuza de 7-metilguanosina (en extremo 3') y una cola de poli-A (en extremo 5'), la eliminación por corte enzimático de ciertas secuencias que no codifican aminoácidos llamadas intrones (proceso de *splicing*), y la edición de bases. Este procesamiento previo del transcripto primario en el núcleo es necesario para que éste pueda atravesar la membrana nuclear y dirigirse al citoplasma, donde será traducido a proteína por medio de los ribosomas (Figura 1.7). A diferencia de lo que sucede en procariotas donde los procesos de transcripción y traducción ocurren acoplados espacial y temporalmente, en eucariotas estas organelas, compuestas por **ARNr** y proteínas, son las estructuras donde ocurre la traducción, el proceso que consiste en interpretar el mensaje cifrado en el ARNm (que proviene del lenguaje del ADN, dado por la secuencia de nucleótidos) y traducirlo a un lenguaje de aminoácidos que conformarán una proteína específica. De aquí que este cambio de lenguaje se denomine traducción. Los aminoácidos llegan al ribosoma mediados por un tipo de ARN mucho más pequeño llamado ARN de transferencia (**ARNt**). Cada molécula de ARNt transporta e incorpora un aminoácido específico a la cadena de proteína que se está formando, la cual se pliega en una estructura tridimensional compleja con la ayuda de proteínas chaperonas que le dan estabilidad, mientras adquiere su conformación funcional correcta.

Este cambio de lenguaje es posible gracias a la existencia de un **código genético** (Tabla 1.2) que vincula la información en forma de tres nucleótidos seguidos (triplete o codón) con un aminoácido específico, a través del anticodón presente en el ARNt.

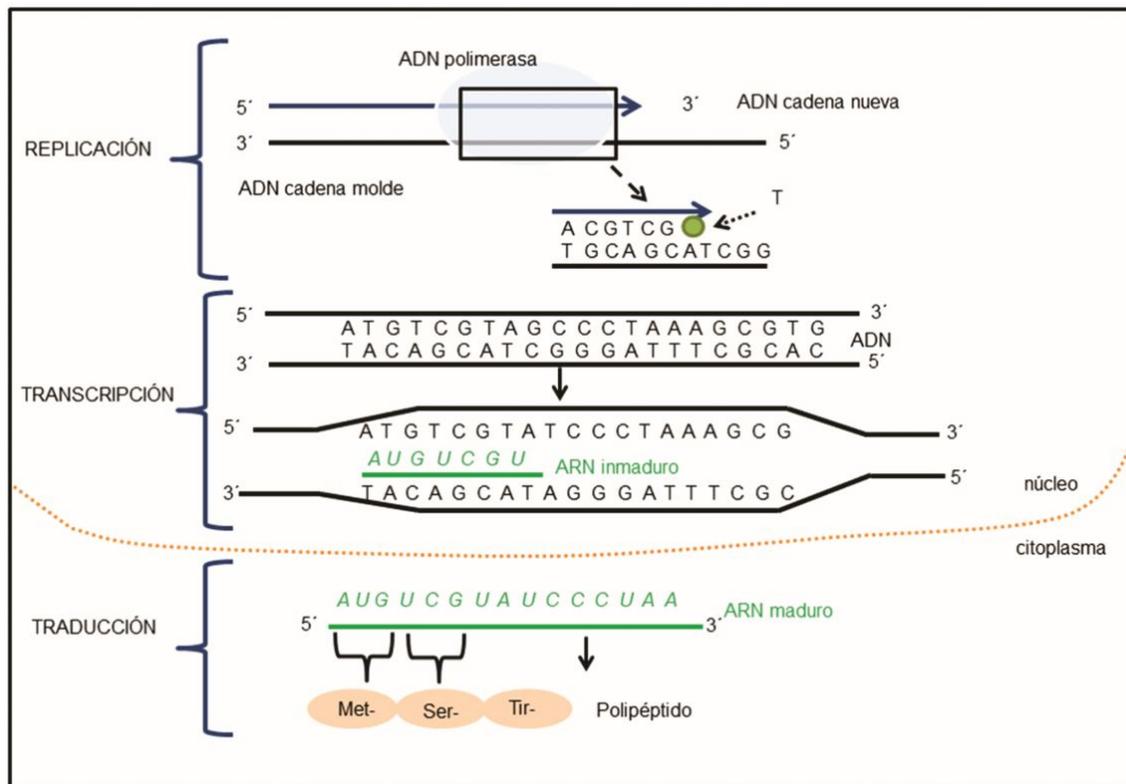


Figura 1.7. Diagrama que ilustra cómo se replica la información y a través de qué pasos se traduce a proteínas (esquema para células eucariotas).

El Código Genético

El **código genético** haciendo referencia a la definición de código, hace de nexo entre un lenguaje y otro. El cambio de lenguaje en este caso es desde la secuencia nucleotídica presente en el ARNm a una secuencia de aminoácidos que conformarán la proteína, la correspondencia entre estos “lenguajes” están plasmadas en el código genético. El mismo está organizado dando la equivalencia de tripletes o codones de nucleótidos ubicados en el ARNm y los equipara o relaciona con los 20 aminoácidos hallados en las proteínas. Sólo el triptófano y la metionina tienen un único codón cada uno, mientras que todos los demás aminoácidos son codificados por dos, tres, cuatro o seis codones (Tabla 1.2). Esta característica del código se denomina **redundancia**. Cabe destacar que existen tres codones que ningún aminoácido corresponde con ellos, destacado en rojo en la tabla 1.2, determinando el final de la traducción o codón de *stop*.

Tabla 1.2: El código genético consiste en 64 codones y los aminoácidos específicos para estos codones.

		Segunda base				
		U	C	A	G	
Primera base	U	UUU Fenilalanina	UCU	UAU Tirosina	UGU Cisteína	U
		UUC	UCC Serina	UAC	UGC	C
		UUA Leucina	UCA	UAA Finalización	UGA Finalización	A
		UUG	UCG	UAG Finalización	UGG Triptófano	G
	C	CUU	CCU	CAU Histidina	CGU	U
		CUC	CCC Prolina	CAC	CGC Arginina	C
		CUA Leucina	CCA	CAA Glutamina	CGA	A
		CUG	CCG	CAG	CGG	G
	A	AUU	ACU	AAU Asparagina	AGU Serina	U
		AUC Isoleucina	ACC Treonina	AAC	AGC	C
		AUA	ACA	AAA Glicina	AGA Arginina	A
		AUG Metionina	ACG	AAG	AGG	G
	G	GUU	GCU	GAU Ac. Aspártico	GGU	U
		GUC Valina	GCC Alanina	GAC	GGC Glicina	C
		GUA	GCA	GAA Ac. Glutámico	GGA	A
		GUG	GCG	GAG	GGG	G

Algunos conceptos sobre Herencia Mendeliana

Los primeros trabajos sobre genética fueron realizados por Gregor Mendel (1822-1884), a menudo llamado el "padre de la genética", quien estudió la herencia de siete características diferentes en las plantas de guisantes (altura, color de la flor, color y forma de la semilla, entre otros), trabajando con **líneas puras** (en este caso, plantas que se obtienen por autofecundación, manteniendo la homogeneidad de su composición genética, son homocigotas para las características analizadas). En uno de sus primeros experimentos utilizó polen de una planta de flores blancas para polinizar una planta de flores púrpuras. Estas plantas de líneas puras constituyen la generación parental (P). Todas las plantas resultantes de ese cruzamiento tenían flores de color púrpura. Esta generación de descendientes se denomina primera generación filial o filial 1 (F1). Mediante autofecundación de plantas de la F1 Mendel obtuvo una nueva generación filial o segunda filial (F2) de plantas de flores púrpuras y plantas de flores blancas. En este y otros experimentos, Mendel advirtió que al cruzar progenitores con variantes distintas (fenotipos blanco y púrpura) de un carácter (color de la flor) se obtiene una F1 que exhibe una de las variantes parentales o **fenotipo** (aparición o manifestación de una característica genética). Además, cuando se obtiene una F2 mediante autofecundación de la F1, se observan ambos fenotipos parentales con una frecuencia de $\frac{3}{4}$ para el fenotipo que dominó la F1 y de $\frac{1}{4}$ para el fenotipo ausente en la F1, que reaparece en la F2.

Todo ello condujo a Mendel a postular algunas conclusiones:

Concepto de Dominancia: cuando dos variantes distintas de un carácter se encuentran juntas, las mismas no se mezclan sino que una de ellas domina en la expresión fenotípica.

Principio de Uniformidad de los híbridos: hace referencia a la primera generación filial (F1) y explica que cuando se cruzan dos individuos de raza pura (homocigotos), la primera genera-

ción filial producto de ese cruzamiento entre dos líneas distintas, estará formada por individuos híbridos (heterocigotos), que serán iguales entre sí tanto en su composición genética (genotípicamente) como en la expresión del rasgo (fenotípicamente).

Principio de Segregación: cada individuo es portador de dos elementos heredables (alelos de un gen) que constituyen su genotipo. Los alelos segregan (se separan) en partes iguales durante la formación de gametas, cada gameta recibirá sólo un alelo de los dos que conforman el genotipo diploide de los progenitores.

Las conclusiones de Mendel pueden representarse gráficamente en la figura 1.8, siendo “**A**” el alelo dominante, dando arvejas de color amarilla y “**a**” el alelo recesivo, generando arvejas de color verde (cruzamiento monohíbrido teniendo en cuenta una única característica).

En la figura 1.8 la F1 proviene de un cruce Parental de genotipos homocigóticos AA y aa, generando la F1 con el genotipo heterocigótico Aa. La F2 se representa mediante un cuadro de Punnett, una grilla que ubica a las gametas de un progenitor en la primera fila y a las gametas del otro en la primera columna, donde se observan los genotipos y fenotipos. Dado que las gametas segregan en partes iguales, cada genotipo obtenido tiene una probabilidad de $\frac{1}{4}$. Las proporciones fenotípicas esperadas resultan entonces en $\frac{3}{4}$ de fenotipo dominante ($\frac{1}{4}$ AA más $\frac{2}{4}$ Aa, amarillas) y $\frac{1}{4}$ de recesivo aa (verdes).

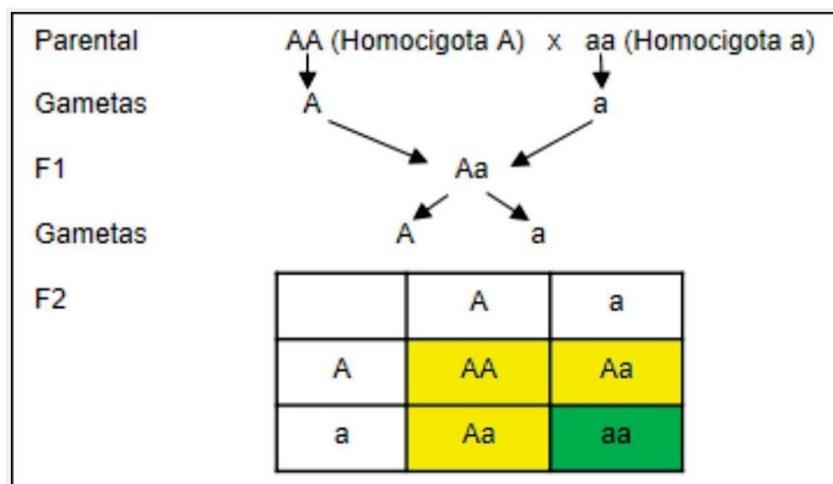


Figura 1.8: Cruce monohíbrido. Utilización de un cuadro de Punnett para generar la F2.

Posteriormente Mendel realizó experimentos con líneas de plantas que diferían en variantes para dos caracteres (cruzamiento dihíbrido) (Figura 1.9). Cruzando plantas que producían semillas lisas y amarillas (AABB) con plantas que producían semillas verdes y rugosas (aabb), obtuvo una F1 de plantas que producían semillas lisas y amarillas (AaBb). Mediante autofecundación de la F1 obtuvo una F2 con las siguientes proporciones genotípicas y fenotípicas:

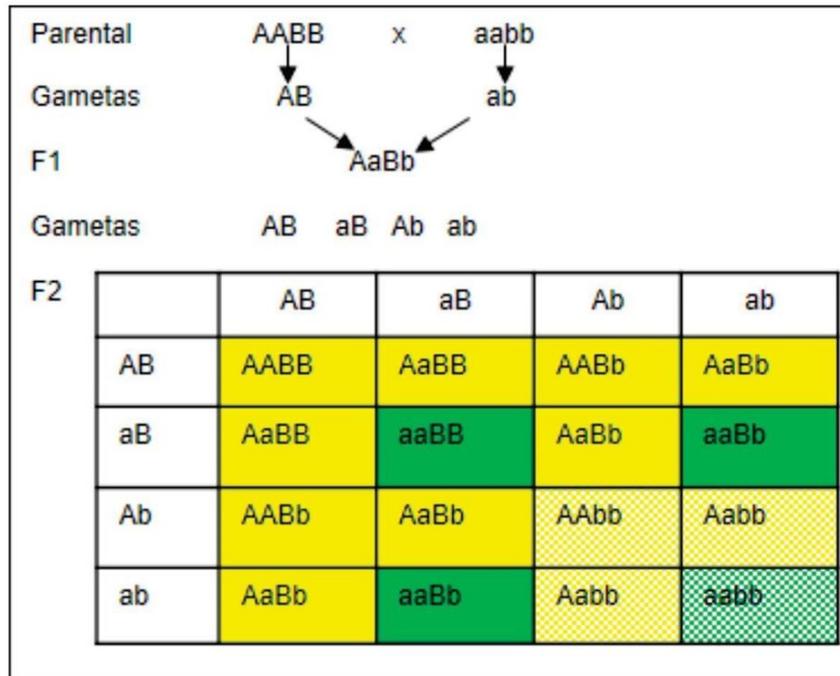


Figura 1.9. Cruce dihíbrido mendeliano. La F1 heterocigota se autofecunda y da lugar a la F2, que se calcula utilizando un cuadro de Punnett, donde se presentan las proporciones genotípicas y fenotípicas.

A partir de este y otros experimentos, Mendel postuló la **ley de distribución independiente**, que establece que los alelos de dos (o más) genes diferentes se reparten en los gametos de forma independiente uno del otro. En otras palabras, el alelo de un gen que recibe una gameta no influye en el alelo que recibe la misma gameta, de otro gen.

En 1902 y 1903, Walter Sutton y Theodor Boveri respectivamente publicaron trabajos independientes que propusieron lo que ahora llamamos la **teoría cromosómica de la herencia**. Esta teoría postula que los genes individuales se encuentran en lugares específicos (cada uno de ellos llamado locus) en cromosomas particulares. De esta manera, el comportamiento de los cromosomas durante la meiosis puede explicar por qué los genes se heredan de acuerdo con las leyes de Mendel. La teoría cromosómica de la herencia fue propuesta antes de que hubiera cualquier evidencia directa de que los rasgos se portaban en los cromosomas, y al principio fue controversial. Al final, se confirmó por medio del trabajo del genetista Thomas Hunt Morgan y sus estudiantes, quienes estudiando la genética de las moscas de la fruta (*Drosophila melanogaster*) observaron que algunos pares de genes no segregaban al azar, sino que tendían a heredarse juntos. Morgan sugirió que posiblemente los genes estuvieran ubicados en el mismo cromosoma y por lo tanto se trasladaban de manera conjunta durante la meiosis. Además propuso que los genes ligados (rara vez se separan cuando ocurre recombinación), se encuentran juntos en el mismo cromosoma.

Herencia ligada al sexo

La herencia ligada al sexo ocurre en organismos con determinación cromosómica del sexo, donde se presenta un par de cromosomas desiguales denominados heterocromosomas, como por ejemplo el par XY en mamíferos. Si bien estos cromosomas comparten regiones homólogas, muchos loci del cromosoma X no tienen su homólogo en el cromosoma Y. Esta situación se denomina **hemicigosis** y determina que los caracteres que responden a los loci ubicados en el cromosoma X se manifiesten ligados al sexo, mientras que los ubicados en el cromosoma Y se denominan holándricos.

El estudio de la herencia de genes localizados en cromosomas sexuales fue iniciado por Morgan y sus estudiantes en los inicios del siglo XX. Por ejemplo, en las moscas de la fruta el color de ojos salvaje es rojo. Morgan con su trabajo estableció que la herencia del color de ojos blancos, dada por un alelo mutado de carácter recesivo, estaba ligada al sexo y que ello podría explicarse asignando el color de ojos a un locus de la región no homóloga del cromosoma X.

Genealogías

En los seres humanos, animales domésticos y otros organismos el modo de herencia se analiza mediante genealogías o pedigrís, estudiando y construyendo árboles familiares, que indiquen la presencia o ausencia del fenotipo que se analiza. Existen convenios que los genetistas adoptan a la hora de construir genealogías (Figura 1.10).

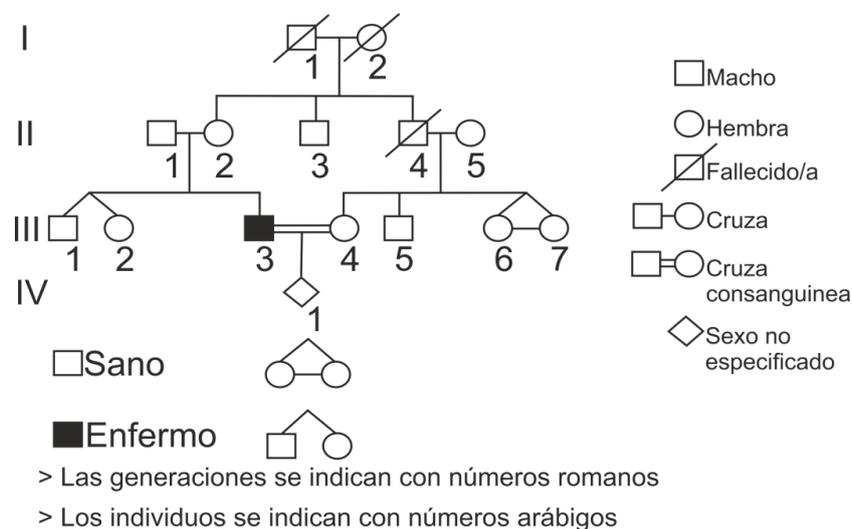


Figura 1.10. Convenios que se utilizan normalmente para genealogías.

Ya que hombres y mujeres difieren en sus cromosomas sexuales, los patrones de herencia ligados al sexo que se observan en humanos pueden explicarse aplicando el mismo principio genético, y se puede predecir cómo se hereda ese carácter. Por ejemplo, los genes que codifican el daltonismo y la hemofilia se encuentran localizados en el heterocromosoma X.

Ampliaciones de la Genética Mendeliana

Sabemos que los alelos se transmiten de padres a hijos, pero existen modos de herencia que generan modificaciones y ampliaciones de los principios básicos de Mendel. A menudo las variantes fenotípicas que se observan resultan de la interacción entre alelos del mismo locus o de loci distintos, estos modos de herencia más complejos se detallan a continuación.

Variaciones de la dominancia

Las siete características que Mendel estudió presentan dominancia completa y dos variantes alélicas en cada una de ellas (por ejemplo semillas lisas y rugosas) debido a que el fenotipo del heterocigota es igual al de uno de los homocigotas parentales. Pero él también observó que otras características no tenían rasgos que mostraran este tipo de dominancia. Cruzó dos variedades homocigotas que diferían en el tiempo de floración y observó que la F1 presentaba tiempos de floración intermedio entre los tiempos de floración de los individuos cruzados pertenecientes a la generación parental. Cuando el heterocigota presenta fenotipo cuya presentación es intermedia a la de los homocigotas, se habla de **dominancia incompleta**. Otro tipo de interacción entre los alelos de un mismo gen, es la **codominancia**, en la que el fenotipo del heterocigota no es intermedio entre los fenotipos de los homocigotas, sino que expresa simultáneamente ambas variantes alélicas.

Alelos letales

Muchos productos génicos son esenciales para la supervivencia de un organismo y las mutaciones ocurridas en las secuencias que los codifican pueden generar pérdida de función y afectar la síntesis de los mismos. Cuando un gen presenta tal tipo de mutación se comporta como **alelo letal**, causando la muerte en una etapa del desarrollo, por lo que algunos genotipos desaparecen en la progenie. Un ejemplo es el pelaje amarillo de los ratones que se obtiene por una mutación que resulta letal en homocigosis. Si se cruzan ratones amarillos heterocigotas ($A^Y A^y$), en condiciones normales se esperaría que este cruce produjera $\frac{1}{4} A^Y A^Y$, $\frac{1}{2} A^Y A^y$ y $\frac{1}{4} A^y A^y$, y resultará en $\frac{3}{4}$ de amarillos y $\frac{1}{4}$ de agutí. Sin embargo, los ratones homocigotas $A^Y A^Y$ son concebidos pero nunca completan el desarrollo, lo que deja una relación de 2:1 de ratones amarillos ($A^Y A^y$) y ratones agutí ($A^y A^y$).

Epistasis

La epistasis se produce cuando el carácter estudiado está gobernado por más de un locus. La situación más sencilla que podemos imaginar sería la de un carácter controlado por dos loci, y cada locus con un par de alelos: A, a y B, b. En este caso, además de las influencias entre alelos del mismo locus (influencia de A sobre a, e influencia de B sobre b), se producen influencias entre alelos de distintos loci (influencia de los alelos A y a sobre los alelos B y b, o viceversa). En la tabla 1.3 se muestran las proporciones fenotípicas mendelianas esperadas para la descendencia de un cruce dihíbrido, junto a algunas posibles alteraciones debidas a diferentes tipos de epistasis.

Tabla 1.3: Obtención de las proporciones dihíbridas modificadas a partir de los diferentes tipos de interacciones génicas.

Tipo de interacción génica	A-B-	A- bb	aa B-	aabb
Proporciones Mendelianas	9	3	3	1
Epistasis dominante simple de A sobre B/b ejemplo color en calabaza	12		3	1
Supresión dominante de A sobre B ejemplo color del plumaje en gallinas	13 (9+3+1)		3	
Epistasis recesiva simple de aa sobre B/b ejemplo color del pelaje en ratones	9	3	4	
Epistasis recesiva doble / Genes complementarios ejemplo color de la flor de la calabaza	9	7		
Interacción doble/ Efecto acumulativo ejemplo forma del fruto en calabazas	9	6		1
Epistasis dominante doble/ Genes duplicados ejemplo color del grano de trigo	15			1

Existen muchos caracteres morfológicos que están gobernados por más de un locus. En muchas especies vegetales el carácter coloración de la flor está controlado por, al menos, dos loci distintos. El carácter coloración del pelaje en muchas especies animales está determinado por tres o más loci distintos. Por tanto, las epistasis resultantes pueden ser bastante complejas.

Genes ligados

La segunda ley de Mendel postula la segregación independiente de alelos de diferentes genes ubicados en distintos loci. Sin embargo, no todos los genes obedecen estrictamente a esta ley ya que muchos pueden estar ubicados en un mismo cromosoma. Para poder comprender este fenómeno debe analizarse lo acontecido durante el proceso de meiosis: durante la Anafase I ocurre la separación de cromosomas homólogos en diferentes células hijas (la ploidía se reduce, por ello es denominada fase reduccional). Además, se debe tener en cuenta que cada cromosoma es portador de varios loci de diferentes genes, y concluir que durante la meiosis segregan independientemente los loci que se encuentran ubicados en diferentes cromosomas, pero aquellos que se encuentran dentro de un mismo cromosoma permanecen juntos. Cuando permanecen juntos, se los denomina **genes ligados**. Sin embargo, existe la posibilidad de que aún aquellos genes que se encuentran ligados dentro de un mismo cromosoma segreguen a diferentes gametas. Esto se debe a que durante la Profase I de la meiosis aparecen una o más estructuras en forma de cruz denominadas quiasmas, formadas por cromátidas no hermanas de cromosomas homólogos. Pueden ocurrir en distintas posi-

ciones a lo largo del brazo cromosómico, aunque su posición parece no ser azarosa. Representan un punto de entrecruzamiento o crossing-over que consiste en la rotura y unión entre cromátidas no hermanas con intercambio de segmentos entre las mismas. Este intercambio llamado **recombinación** permite que los cromosomas adquieran nuevas combinaciones alélicas, ausentes en la generación parental, rompiendo el ligamiento entre alelos de genes que se ubican a cada lado del punto de entrecruzamiento.

Ejercicios

1-a) A continuación se muestra un fragmento de ADN codificante. Complete la tabla agregando el ARNm y el péptido que se generará a partir de él.

ADN	5´	A	T	G	C	C	T	G	G	C	T	G	A	3´
ARNm	5´													3´
aa	Extremo N													Extremo C

b) ¿Cómo se llama el proceso que permite el paso de la información desde el ADN al ARNm? ¿Dónde ocurre en los organismos procariontes y en los eucariotes?

c) ¿Cómo se denomina el proceso que permite pasar el mensaje cifrado en el ARNm y pasarlo a una cadena de aminoácidos (aa)? ¿En qué sitio ocurre?

Resolución

a). ARNm: 5´ AUGCCUUGGUGA 3´

aa: metionina-prolina-triptofano-STOP

b) El proceso se denomina *transcripción* y ocurre en el citoplasma de células procariontes o en el núcleo de células eucariotes.

c) El proceso que permite pasar de un lenguaje de nucleótidos del ARN a aminoácidos de la cadena proteica se llama *traducción* y ocurre en el nucleoplasma de células procariontes y en el citoplasma de células eucariotes

2- En cierta especie de plantas el tallo largo (A) es dominante sobre el tallo corto (a) ¿Cómo podrán ser los descendientes del cruce de plantas de tallo largo con plantas de tallo corto, ambas homocigóticas? Realizar un esquema del cruzamiento.

Resolución: AA (planta homocigota de tallo alto) X aa (planta homocigota de tallo corto). Toda la descendencia (F1) va a ser Aa (heterocigota) de tallos altos si el carácter expresa dominancia completa.

3- Enumere los diferentes gametos producidos por los siguientes genotipos y en qué proporciones:

a) AA BB

b) aa Bb Cc

c) Aa Bb Dd

Resolución: a) Todos AB; b) $\frac{1}{4}aBC$ - $\frac{1}{4}aBc$ - $\frac{1}{4}abC$ - $\frac{1}{4}abc$; c) $\frac{1}{8} ABD$ - $\frac{1}{8} abd$

4- En el hombre la falta de pigmentación, denominada albinismo, es el resultado de un alelo recesivo "a" y la pigmentación normal es consecuencia de su alelo dominante "A". Dos progenitores normales tienen un hijo albino. Determine:

a) el genotipo de los progenitores

b) el genotipo de los hijos de un hombre albino con una mujer con pigmentación normal heterocigota (Aa).

Resolución: a) dos progenitores con pigmentación normal tienen un hijo albino, es porque ambos padres tienen que ser heterocigóticos: Aa x Aa.

b) el hombre albino (aa) con una mujer heterocigota (Aa): la descendencia es mitad de los hijos aa (albinos) y mitad de los hijos Aa (pigmentación normal).

5-Dos pares de alelos determinan el color de los bulbos de cebolla. Una variedad roja es cruzada con una variedad blanca y producen una F1 toda roja. La F2 resultante consiste en 46 cebollas blancas, 36 amarillas y 108 rojas.

a) ¿A qué proporción epistática se aproximan estos datos?

b) ¿Cómo se denomina esta interacción?

Resolución: a) Los datos se aproximan a una proporción 9:3:4. (Total de la F2 es 190, entonces $46 \times 16 / 190 = 4$, $36 \times 16 / 190 = 3$, $108 \times 16 / 190 = 9$).

b) Epistasis recesiva simple

6- Artrogriposis múltiple, síndrome que afecta a uno de cada 3000 nacimientos. Esta patología es causada por una mutación recesiva (a) que afecta el normal desarrollo del tejido nervioso y

muscular. Cuando se encuentra en condición homocigótica se observa muerte al nacer o fetos muertos. La heterocromía iridis u ojo blanco es una pigmentación ocular anormal que se debe al genotipo homocigótico para un gen autosómico recesivo, siendo normal el individuo BB. ¿Cuáles son los fenotipos esperados entre los descendientes de animales de ojos blancos y heterocigotas para la enfermedad de Artrogriposis?

Resolución: *los progenitores poseen los ojos blancos por lo tanto el genotipo es (bb), y son portadores de la enfermedad de Artrogriposis (Aa), por lo tanto el genotipo de los progenitores es Aabb. Las proporciones genotípicas y fenotípicas de este cruce (Aabb x Aabb): AA $\bar{a}\bar{b}$ (1/4), Aa $\bar{a}\bar{b}$ (2/4) y aa $\bar{a}\bar{b}$ (1/4), esta proporción es letal, por lo tanto la proporción fenotípica es: 1/3 (AA $\bar{a}\bar{b}$) sanos para la enfermedad de Artrogriposis y ojos blancos, y 2/3 (Aa $\bar{a}\bar{b}$), portadores de la enfermedad de Artrogriposis y ojos blancos.*

Referencias

- Brown, T. (2008). *Genomas*. 3ra Edición. Editorial Panamericana, Buenos Aires.
- Cooper, G. M. & Hausman, R. E. (2011). *La Célula*. Editorial Marbán, España.
- GenBank. www.ncbi.nlm.nih.gov Fecha de acceso: 5 de agosto de 2020.
- Griffiths, A. J. F., Lewontin, R. C., Carroll, S.B. & Wessler, S.R. (2008). *Genética*. 9na Edición. Editorial Mc Graw Hill, Madrid.
- Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., Palladino, M. A. & Killian, D. (2019). *Concepts of genetics*. 12th edition. Pearson Education Limited, London.
- Pierce, B. A. (2005). *Genética: Un enfoque conceptual*. Editorial Médica Panamericana.
- Ross, M. H. & Pawlina, W. (2007). *Histología. Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular*. Editorial Médica Panamericana.
- Strickberger, M. W. (1988). *Genética*. Ediciones Omega, Barcelona.
- Suzuki D. T., Griffiths, A. J. F., Millar, J. H. & Lewontin, R. C. (1994). *Introducción al análisis genético*. Editorial Interamericana. McGraw-Hill, Madrid.
- Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M. & Losick R. (2004). "Ch9-10", *Molecular Biology of the Gene*. 5th Edition. Editorial Pearson Benjamin Cummings. CSHL Press, pp. 233-291.

CAPÍTULO 2

Regulación de la Expresión Génica

Melina Anello, Nathalie Arnal y Gisela Barbisan

Regulación de la expresión génica en Procariotas

Los organismos procariotas poseen aproximadamente 4000 genes, de los cuales sólo se expresa una pequeña parte dependiendo del ambiente en el que está creciendo la bacteria. No todos los productos génicos se necesitan de forma simultánea, ni a los mismos niveles. Es por eso, que existe un sistema de regulación que va a permitir, o no, la transcripción y traducción de determinados genes en un momento dado. El control de la síntesis de las macromoléculas se denomina regulación de la expresión génica.

Los procariotas deben utilizar parte de su dotación genética para poder adaptarse adecuadamente a su entorno, con el que están estrechamente relacionados y del que son muy dependientes y, de este modo, garantizar su supervivencia. Estos organismos tienen los procesos de transcripción y traducción acoplados, es decir, que se producen uno inmediatamente a continuación del otro. Además, numerosos genes se encuentran organizados en operones, los que están conformados por una unidad regulatoria seguida de varios genes estructurales que dan origen a proteínas, las cuales cumplen funciones relacionadas y presentan una regulación coordinada. Estos genes suelen transcribirse juntos en un solo ARNm, denominado ARNm policistrónico.

Estructuralmente, un **operón** consta de una secuencia de ADN previa a los genes estructurales, que es la secuencia promotora o promotor, o secuencia de inicio, donde la ARN polimerasa se une al ADN para iniciar la transcripción. Entre el promotor y los genes estructurales se sitúa el operador, una secuencia de ADN donde se une la proteína reguladora. El operador está a menudo solapado con el promotor de forma tal que, dependiendo de si tiene (o no) unida una proteína reguladora, la ARN polimerasa podrá realizar (o no) la transcripción (Figura 1).

Debemos mencionar también la existencia de un gen regulador (R) que no forma parte del operón, pero es necesario para su funcionamiento. El gen regulador codifica la proteína reguladora que, como fue mencionado anteriormente, interactúa con el sitio operador controlando la síntesis de los genes estructurales. Este gen regulador, a su vez cuenta con su propio promotor y una sola región estructural, de este modo vemos que en los organismos procariotas podemos encontrar genes organizados en operones y otros que no lo están.

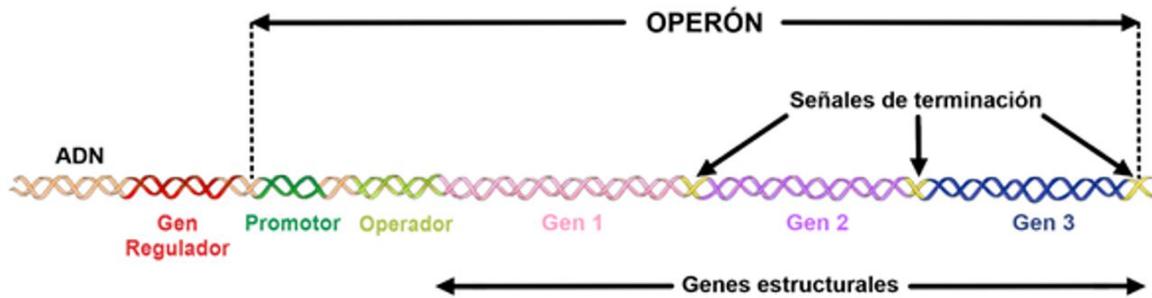


Figura 2.1. Esquema simplificado de la estructura de un operón procarionta.

Cada uno de los niveles de los que depende la expresión de la información génica puede estar sometido a algún tipo de regulación, aunque lo más frecuente es la regulación al inicio de la transcripción. En este sentido, podemos encontrar dos modos de regulación: la inducción y la represión. Teniendo en cuenta el tipo de regulación que se presenta, podemos realizar una primera clasificación de los operones en inducibles y reprimibles.

Sistemas inducibles: en estos sistemas es el sustrato el que provoca la síntesis de los genes estructurales. Por esta razón, al compuesto que desencadena la síntesis se lo denomina *Inductor*. Son sistemas que están apagados y pueden activarse por la presencia del inductor. Los sistemas inducibles se relacionan con procesos catabólicos o de degradación.

Sistemas represibles o reprimibles: en estos sistemas una molécula, normalmente aquella que es sintetizada a partir de la expresión de los genes estructurales, impide la expresión del operón. A esta molécula se la denomina *corepresor*. Son sistemas que están activos de manera predeterminada, pero se pueden desactivar por la acción del corepresor. Los sistemas represibles se corresponden con procesos anabólicos o de síntesis.

Tanto si la regulación es inducible como reprimible, puede estar bajo control positivo y negativo. En el caso de **control negativo** el producto del gen regulador reprime o impide la expresión de los genes estructurales, actuando como un represor. Como consecuencia la expresión génica se produce siempre, a menos que sea desconectada por el represor. En cambio, en el **control positivo** el producto del gen regulador activa la expresión de los genes estructurales, por eso la transcripción se produce sólo si la molécula activadora estimula directamente la producción de ARNm.

En principio existen cuatro tipos de sistemas posibles de regulación de la expresión génica:

- Tipo 1:** Inducible, control negativo (operón lactosa y operón galactosa)
- Tipo 2:** Inducible, control positivo (operón lactosa, operón arabinosa y operón maltosa)
- Tipo 3:** Represible, control negativo (operón triptófano y operón histidina)
- Tipo 4:** Represible, control positivo (no se han descrito)

Un operón puede estar sujeto a más de un tipo de control, como sucede en el caso del operón lactosa (operón lac), que está bajo control negativo ejercido por la **proteína represora** y bajo control positivo ejecutado por **una proteína activadora por catabolitos (CAP)** también llamada **proteína activadora del AMP cíclico (CRP)**, del inglés **catabolite repressor protein**.

Operón Lactosa

Escherichia coli presenta un único cromosoma circular que cuenta con la información genética necesaria para regular la expresión de muchos de sus genes en función de los niveles intracelulares de metabolitos específicos, que varían según el medio ambiente que rodea a la célula. Los estudios genéticos sobre la utilización de lactosa como fuente de carbono permitieron describir un modelo de regulación de expresión génica, el **operón lac**, que es uno de los ejemplos mejor caracterizados de regulación a nivel de la transcripción. Dicho operón está formado por una serie de genes estructurales, “z”, “y”, “a”, que codifican tres enzimas: **β -galactosidasa (z)**, **galactósido permeasa (y)** y **tiogalactósido transacetilasa (a)**. La β -galactosidasa es la encargada del clivaje de la lactosa en glucosa y galactosa, mientras que la función de la permeasa es facilitar el ingreso de este azúcar en la célula. Por su parte, la tiogalactósido transacetilasa tiene la función de catalizar la transferencia del grupo acetilo de la acetil Coenzima A al 6-OH de un aceptor tiogalactósido. Así, cuando la célula utiliza la lactosa como combustible, se necesita la acción catalítica de las tres enzimas mencionadas. El conjunto formado por los tres genes estructurales, el promotor y el operador constituye estructuralmente el operón lac. En la figura 2 se muestran las partes del operón lac y su funcionamiento cuando está presente la lactosa como única fuente de energía. Cuando las bacterias crecen en un medio sin lactosa, el operón lac es rápidamente reprimido por una proteína llamada **represor**, codificada por el gen I, que no forma parte del operón propiamente dicho. Esta proteína represora se une al **operador (O)** bloqueando la transcripción de los genes estructurales del operón lac. La unión de lactosa (alolactosa) al represor genera un cambio conformacional en él, permitiendo su salida del sitio O. Una vez liberado el sitio O del represor, el ARN polimerasa puede iniciar la transcripción.

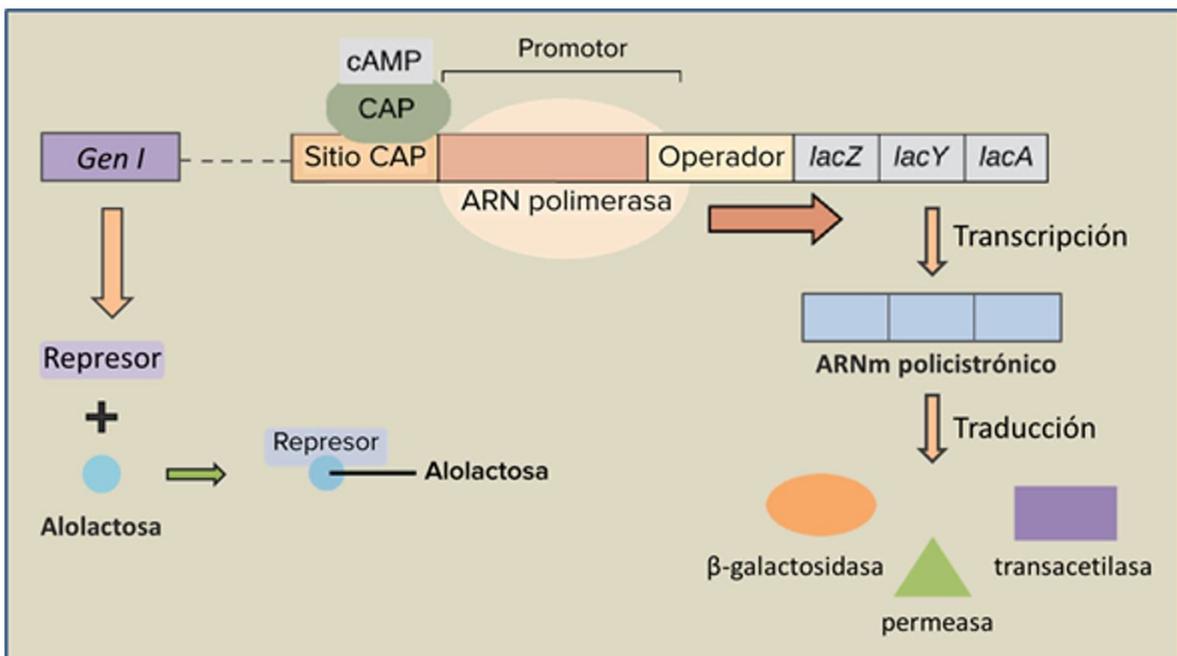


Figura 2.2. Estructura y funcionamiento del operón lac en presencia de lactosa (y ausencia de glucosa).

El operón lac presenta además otro tipo de regulación mediada por el **adenosín monofosfato cíclico** (AMPc) y la **proteína CAP** (*catabolite activator protein*) o **CRP** (*catabolite repressor protein*). La proteína CAP se encuentra en forma de dímero y sólo es activa cuando lleva unido AMPc. El complejo CAP-AMPc se une a un sitio CAP, estimulando la fijación de la ARN polimerasa al promotor.

Cuando hay glucosa en el medio extracelular *E. coli* cataboliza directamente, y preferentemente, este azúcar sin la inducción de ninguna enzima. A medida que se consume la glucosa, la célula comienza a producir AMPc. Una vez que la mayoría de la glucosa ha sido catabolizada, los niveles de AMPc son muy altos favoreciendo la transcripción de los genes estructurales del operón lac. Los mutantes para la enzima adenilato ciclasa (que no producen AMPc) o para la proteína CAP presentan niveles muy bajos de expresión de los genes del operón lac. Por lo tanto, sin CAP o sin AMPc el sistema permanecería apagado.

En bacterias, este mecanismo de control positivo se puede hacer extensivo a otros operones correspondientes al catabolismo de otras fuentes de carbono, como la arabinosa.

Operón triptófano

El operón triptófano (operón Trp) de *E. coli* posee cinco genes estructurales necesarios para la síntesis de este aminoácido a partir de precursores sencillos. Si hay triptófano (trp) en el medio de crecimiento, la célula lo toma y no necesita sintetizarlo, por lo tanto, el operón está reprimido. Esta represión es llevada a cabo por medio de una proteína represora. Cuando hay trp en el medio, éste se une a la proteína represora haciendo que cambie de conformación y sea capaz de unirse al sitio operador inhibiendo la expresión del operón. Por este motivo, se dice que es un sistema reprimible, actuando el mismo trp como **correpresor**. Es importante tener en cuenta que la represión no es total. El operón trp posee además otro mecanismo regulatorio: la *atenuación*.

La **atenuación** implica la terminación de la transcripción del operón antes del inicio de la transcripción de los genes estructurales, y su frecuencia depende de los niveles de trp en la célula. El proceso de atenuación ocurre en el sitio atenuador ubicado hacia la región 3' del promotor. Esta zona está compuesta por 4 regiones que presentan sitios complementarios que pueden aparearse formando estructuras en horquillas (Figura 3). Según el trp esté presente o no, pueden generarse distintas conformaciones en la hibridación de estas secuencias. La región 1 determina si la secuencia 3 va a hibridar con la 2 o con la 4, y codifica un pequeño péptido que posee dos residuos trp. Si se aparean las regiones 2 y 3 no se produce la estructura atenuadora (horquilla entre las regiones 3 y 4). Cuando comienza la transcripción de este operón, simultáneamente se produce la traducción. Si hay trp en el medio, va a haber ARNt cargados con este aminoácido permitiendo la traducción de la región 1 por parte de los ribosomas. Al traducirse la región 1, la maquinaria de traducción queda parada sobre la región 2, impidiendo que ésta se una con la región 3. Por lo tanto, la región 3 se aparea con la 4 formando una hor-

quilla que es seguida por una secuencia rica en residuos uracilos, formando así la estructura atenuadora. La estructura atenuadora implica un mecanismo de finalización de la transcripción del tipo Rho-independiente. Si no hay *trp* en el medio, no se puede traducir la región 1, la maquinaria de traducción queda detenida en este lugar permitiendo que las regiones 2 y 3 se unan, y no se forma la estructura atenuadora. Esto permite la completa expresión del operón *trp* para poder sintetizar este aminoácido.

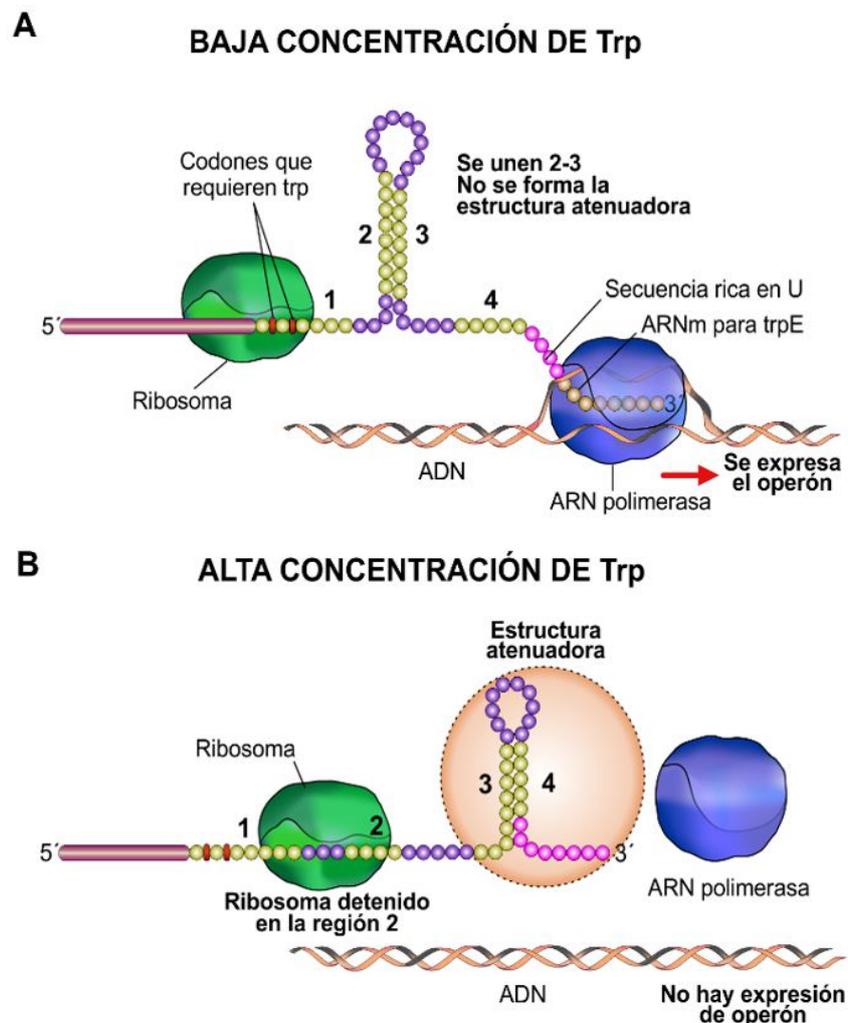


Figura 2.3. La zona atenuadora posee 4 regiones auto complementarias. La región 1 posee dos codones que requieren *trp* para ser traducidos. Dependiendo de los niveles de *trp* en el medio donde se encuentra, la bacteria va a necesitar sintetizar, o no, *trp*. **A.** Cuando hay baja concentración de *trp* en el medio no hay ARNt cargados con *trp* para traducir la región 1, por lo que la ARN polimerasa queda detenida en esa región. Las regiones 2 y 3 se pueden aparear formando una horquilla que está separada de la secuencia poli U por la región 4, por lo tanto, no se forma la estructura atenuadora. **B.** Cuando hay alta concentración de *trp* en el medio se puede traducir la región 1 y la ARN polimerasa queda detenida en la región 2. Las regiones 3 y 4 se unen formando una horquilla que es seguida por la secuencia poli U formando la estructura atenuadora.

La atenuación es un sistema de control genético en una amplia variedad de operones biosintéticos, especialmente de aminoácidos. En todos los casos el segmento inicial del polipéptido transcrito es rico en el aminoácido que controla dicho operón. Otros ejemplos de operones que utilizan este sistema de control son el operón *his* (síntesis de histidina), operón *phe* (sínte-

sis de fenilalanina) y el operón leu (síntesis de leucina). Algunos de estos operones sólo poseen atenuación como mecanismo de control, mientras que otros poseen además la regulación por represión.

A lo largo de la historia se ha logrado un mejor conocimiento del funcionamiento de los operones gracias a la incorporación de diploides parciales en el estudio. En genética microbiana se describen como **diploides parciales** o **merodiploides** a aquellos organismos haploides que han incorporado un fragmento exógeno que contiene parte de su información genética, duplicándola. Así, dicha información se presenta tanto en el cromosoma bacteriano como en el ADN exógeno incorporado. En el caso de las bacterias se produce por la presencia de plásmidos (F'), moléculas de ADN extracromosómicas circulares o lineales que se replican y transcriben independientemente del ADN cromosómico.

Regulación de la expresión génica en Eucariotas

Los organismos eucariotas superiores están constituidos, en su mayoría, por numerosos órganos diferenciados, estando cada órgano formado por diferentes tipos de células. Sin embargo, los millares de células que constituyen estos organismos provienen de una sola célula diploide y para llegar a este resultado, se ponen en juego dos procesos: la multiplicación y la diferenciación celular. La diferenciación es el resultado de "encender" y "apagar" diferentes genes. Pero para obtener un organismo "funcional" no es suficiente que sus células se diferencien, sino que también hace falta que éstas respondan de manera adecuada al ambiente. Para esto, es necesario que la expresión de cada uno de los genes que van a expresarse esté perfectamente regulada.

En eucariotas, los sistemas de regulación y selección se realizan en múltiples etapas y a menudo son arborescentes. Un solo gen puede ser regulado por muchos mecanismos diferentes. No existe, pues, un modelo general de regulación como es el caso de los procariontes, sino que existen numerosas posibilidades.

La regulación de la expresión génica en organismos eucariotas puede darse a distintos niveles (Figura 4), a saber:

- Cromatina
- Transcripcional
- Postranscripcional
- Traduccional
- Postraduccional

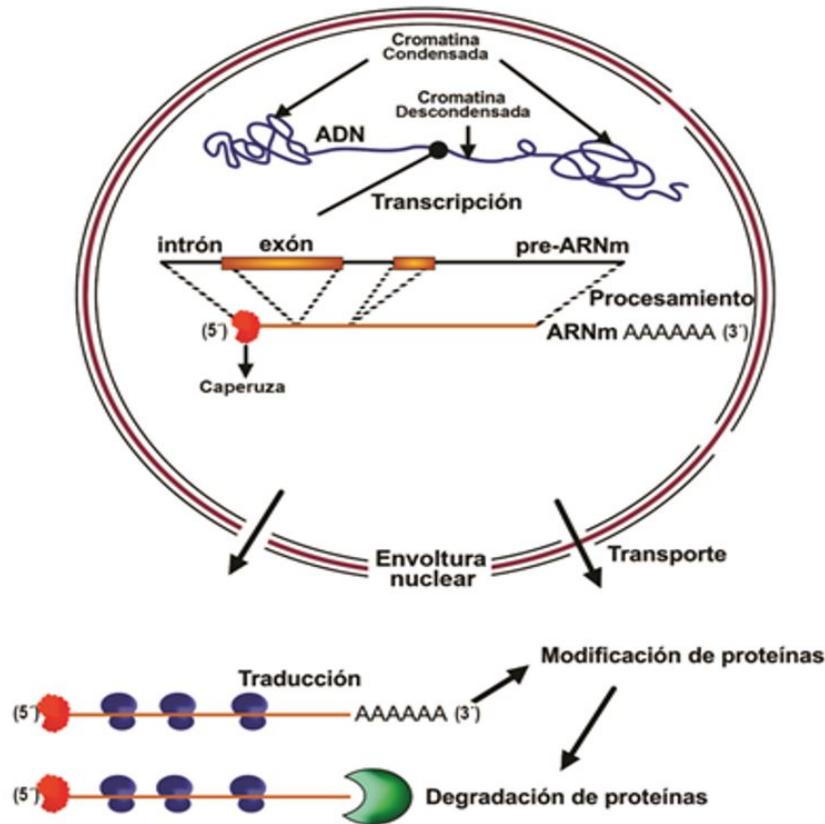


Figura 2.4. Puntos de regulación de la expresión génica en organismos eucariotas.

Condensación de la cromatina

La descondensación de la cromatina representa el primer nivel de regulación. Es a este nivel que se llevará a cabo la selección de los genes que la célula deberá transcribir y aquellos que no debe transcribir. La cromatina está constituida por el ADN enrollado alrededor de una serie de proteínas histónicas formando los nucleosomas. Algunas regiones están fuertemente condensadas en el núcleo interfásico, formando la heterocromatina, transcripcionalmente inerte. Otras regiones se encuentran empaquetadas de forma más relajada, formando la eucromatina, que contiene genes transcripcionalmente activos. Los cambios en la organización de la cromatina, denominados remodelación de la cromatina, son esenciales para muchos procesos celulares, como ser la unión de las polimerasas y el inicio de la transcripción, así como también para la replicación, la reparación y la recombinación del ADN.

La remodelación de la cromatina implica un cambio en la interacción entre el ADN y las histonas en los nucleosomas. La estructura química particular de las histonas es el principal factor determinante del grado de empaquetamiento que presenta la cromatina. Las histonas pueden sufrir varios tipos de modificaciones, entre las cuales encontramos las **acetilaciones**. El agregado de grupos acetilos a residuos conservados de lisinas en el extremo N-terminal es mediado por las enzimas Histona Acetiltransferasas (HATs). Esta modificación provoca una reducción en la afinidad de las histonas por el ADN al neutralizar la carga negativa del ADN, y de esta

manera impedir su interacción con las cargas positivas de las histonas. Esto posiblemente tenga también un efecto en la interacción individual de los nucleosomas, desestabilizando a la fibra de cromatina de 30 nm. Como resultado del proceso de remodelación de la cromatina las secuencias promotoras quedan libres de histonas y son accesibles a las proteínas que inician la transcripción, regulando de esta manera la expresión de los genes correspondientes.

Metilación del ADN

Otra manera de lograr importantes modificaciones en la actividad del genoma es realizando cambios químicos en el mismo ADN. Estos cambios están asociados con el silenciamiento semipermanente de regiones del genoma. Muchas veces pueden involucrar cromosomas completos, y con frecuencia son heredados a las células hijas por medio de la división celular. Tales modificaciones son provocadas por la metilación del ADN.

La metilación del ADN tiene lugar en citosinas que son modificadas a 5-metilcitosina por la adición de un grupo metilo mediada por las enzimas ADN metiltransferasas. La mayoría de los grupos metilo se encuentran en los "dupletes" o "islas" CpG, y, de hecho, la mayoría de las secuencias CpG están metiladas. En vertebrados hasta un 10% del total de citosinas del genoma están metiladas y en las plantas el porcentaje puede llegar hasta un 30%. Podemos distinguir dos tipos de metilación: 1- la **metilación de mantenimiento**, responsable de agregar grupos metilos a la nueva cadena sintetizada, luego de la replicación del genoma, tomando como referencia los sitios metilados de la cadena parental; 2- la **metilación *de novo***, que agrega grupos metilo en posiciones completamente nuevas y cambia de esta manera el patrón de metilación de una determinada región del genoma. Tanto la metilación de mantenimiento como la *de novo* tienen como resultado la represión de la expresión génica. De todos los genes humanos entre el 40% y 50% se localizan cerca de islas CpG. De esta manera encontramos que el estado de metilación de la isla CpG refleja el patrón de expresión del gen adyacente. Los genes de mantenimiento, por ejemplo, debido a que se expresan en todos los tejidos, presentan islas CpG no metiladas. Al igual que como sucede con otros cambios en la cromatina, parece probable que la ausencia de grupos metilo esté asociada con la posibilidad de transcripción y no con el propio acto de la transcripción.

Nivel transcripcional

La transcripción de un gen en estado activo está controlada en el **inicio** por la interacción de la ARN polimerasa con su promotor. En la mayoría de los genes, éste es el punto de control más importante y probablemente sea el nivel más común de regulación. Hasta el momento no existen evidencias de control en otras etapas de la transcripción en las células eucariotas.

Regulación en CIS y en TRANS

Un **elemento regulador en cis** es una secuencia contigua a un gen que tiene un efecto regulador sobre la tasa de transcripción de ese gen. En los eucariontes las secuencias necesarias para la regulación de la transcripción se encuentran en los **promotores** y en regiones denominadas **amplificadores** (también se conocen como enhancers o potenciadores) ubicadas hacia la región 5', alejadas de los promotores. En estas regiones se encuentra toda una serie de elementos cis, como por ejemplo las cajas CAAT y GC, los cuales serán reconocidos por proteínas específicas que funcionan como **factores de transcripción** necesarios para que la ARN polimerasa inicie la transcripción. Estas proteínas pueden modificar la velocidad de la transcripción, regulando el proceso. A este tipo de regulación se la llama **regulación en trans**.

Las proteínas reguladoras que se fijan al ADN son capaces de fijarse tanto a los intensificadores como a los elementos del promotor, o pueden actuar de forma independiente. Algunas proteínas reguladoras activan la transcripción (activadores) y otras la inhiben (silenciadores). Los factores de transcripción contienen al menos dos dominios: uno de fijación al ADN, que permite a la proteína reconocer sus genes "diana" y un dominio de acción sobre la transcripción que provocará los efectos positivos o negativos sobre la transcripción. Este último dominio puede unirse a la ARN polimerasa II o con proteínas reguladoras también llamadas mediadoras. Los factores de transcripción se agrupan en familias de acuerdo con el dominio de fijación que poseen.

Además, ambos tipos de dominio pueden intercambiarse entre los diferentes factores de transcripción, mediante ingeniería genética. De esta forma, una proteína constituida por un dominio de activación de la transcripción proveniente de un factor de transcripción de mamífero acoplado a un dominio de fijación al ADN proveniente de una levadura será perfectamente funcional y activará todos los genes que posean la secuencia diana del dominio de fijación al ADN.

Un ejemplo de una situación en la cual muchos genes están controlados por un solo elemento cis es el de la respuesta al choque térmico. Un aumento de la temperatura apaga la transcripción de algunos genes, enciende la transcripción de los genes de choque térmico y provoca cambios en la traducción de los ARNm. Los genes de choque térmico poseen una secuencia consenso común (HSE) que es reconocida por un factor de transcripción independiente. La activación de este factor ofrece los medios para iniciar la transcripción en un grupo específico de genes que contienen una determinada secuencia diana en su promotor.

Otro ejemplo de regulación en la transcripción es la inducción de la transcripción de genes que participan en el metabolismo de la galactosa en levaduras. La expresión de los genes GAL en levadura está controlada por activadores y represores. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* produce enzimas inducibles que metabolizan la galactosa cuando crece en presencia del azúcar. Sus cinco genes se inducen por el activador GAL4. Participan en la regulación el activador GAL4, un represor GAL80 y una secuencia UAS (upstream activation sequence) asociada a los genes. El represor no se une al ADN, sino al activador formando un complejo y posee además otro dominio para activar la transcripción. GAL4 se

fija a una secuencia específica de 17 pb del UAS que actúa como enhancer. El mecanismo propuesto es el siguiente: en ausencia del inductor (la galactosa), el complejo GAL4-GAL80 se une al sitio de unión de GAL4 en la UAS. Al estar acompañado con GAL80, GAL4 no puede activar la transcripción. En presencia del inductor se disocia GAL80 de GAL4 y ésta puede activar la transcripción de los genes GAL que codifican la quinasa, la transferasa y la epimerasa que convierten la galactosa en glucosa.

Este mecanismo de regulación se ha aprovechado para transformar líneas de mosca *Drosophila melanogaster* que permiten realizar experimentación en regulación génica de eucariotas. La estrategia consiste en insertar la secuencia GAL4 e independientemente en otra línea de moscas la secuencia UAS. Al obtener descendencia entre ambas líneas, se tendrá el sistema completo para experimentar mecanismos de regulación, por ejemplo, cómo funciona un promotor en particular, o cuándo y dónde se expresa una proteína determinada.

Nivel post-transcripcional

A nivel postranscripcional, la regulación de la expresión de los genes eucariotas se subdivide en:

1. Corte y empalme alternativo de exones (Splicing diferencial)
2. Regiones regulatorias de los ARNm
3. Estabilidad y almacenamiento de los ARNm
4. Silenciamiento génico por ARNs pequeños

Corte y empalme alternativo de exones (Splicing diferencial)

Como ya se ha visto, para formar el ARNm maduro existe un proceso de “corte y empalme” o “splicing” mediante el cual se eliminan los intrones, y los exones son unidos de manera consecutiva. Muchos genes se transcriben en un único ARNm maduro, pero los ARNs de algunos genes tienen patrones de **splicing diferencial**. Es decir, un solo gen da lugar a más de una secuencia de ARNm maduro. En tales casos, un solo transcrito primario se empalma en más de una forma, y los exones internos pueden sustituirse, añadirse o eliminarse. En algunos casos, en la misma célula se sintetizan todos los productos (múltiples) posibles, pero en otros casos el proceso se regula de tal manera que los patrones muy específicos de splicing ocurren sólo bajo determinadas condiciones.

Un ejemplo es el de los murciélagos vampiros (*Desmodus rotundus*), que presentan un sensor en un órgano especial de la cara que detecta la radiación infrarroja y les sirve para ubicar a sus presas de sangre caliente. Si bien el gen que codifica este sensor está presente en todos los mamíferos, normalmente sólo se activa frente a temperaturas superiores a los 60 °C para alejarlos del calor excesivo y evitar quemaduras. Sin embargo en ciertos tejidos de estos vampiros, a través de mecanismos de splicing alternativo, el umbral de detección baja a 30 °C, y eso les permite ubicar a sus presas que suelen mantener su cuerpo a 36-37 °C. Este proceso

está presente selectivamente sólo en determinadas áreas del rostro de los vampiros que usan para detectar a sus presas y no en el resto del cuerpo. Se trata entonces de un splicing alternativo específico de la especie y del tejido.

Una de las preguntas más apremiantes respecto al splicing es la determinación de los controles que utilizan estas vías alternas. Se han identificado proteínas que intervienen para desviar el uso de sitios alternos de splicing. Las formas alternas de splicing pueden dar lugar a una variedad de proteínas a partir de un gen individual, así como también pueden introducir un codón de terminación o cambiar un marco de lectura.

Regiones regulatorias de los ARNm

Por otro lado, los ARNm maduros también cuentan con elementos específicos en su secuencia que pueden regular su expresión. La localización de estos elementos son las **regiones no traducidas 5' y 3' (untranslated region, UTR)**.

Las 5'UTR son importantes regiones regulatorias ya que controlan la expresión de los genes a través de distintos elementos presentes en su secuencia: sitios internos de entrada de ribosomas (IRES), sitios de unión a proteínas represoras o activadoras, estructura secundaria de la región, codones de inicio no AUGs, entorno del AUG, codones de inicio previos al marco de lectura (uAUG) y marcos de lectura previos al principal (uORF).

Muchos genes emplean regiones 5'UTR alternativas que regulan la expresión espacial o temporal de los ARNm. Por ejemplo, en ratones de vientre claro y en conejos con el mismo fenotipo, la distribución de pigmentos está controlada por transcritos del gen ASIP con diferentes 5'UTR.

Otra posibilidad de obtener varios tipos de ARNm a partir de un mismo transcrito primario reside en la variabilidad de elección del sitio de poliadenilación, ubicado en la región 3'UTR. Los cambios del sitio de corte y adición de la cola poli A pueden modificar el extremo carboxilo-terminal de la proteína. En estos casos, los diferentes productos de maduración terminan en polipéptidos que poseen actividades totalmente diferentes. La elección de una vía de maduración u otra depende probablemente de factores celulares específicos de tejido o de la ontogénesis.

Estabilidad y almacenamiento de los ARNm

La modificación de la duración de la vida de los mensajeros es un factor importante en la regulación de la expresión de algunos genes. La vida media de los ARNm puede variar en un amplio rango. Los elementos estructurales generales que se encuentran en los extremos 5' y 3' del ARNm, así como los elementos de secuencia específicos ubicados dentro de un transcrito, pueden contribuir a la estabilidad general del mensaje. En este sentido, la presencia del casquete o capuchón 5' (CAP) y de la cola poli-A confiere estabilidad al ARNm y lo protege de la degradación prematura.

Un ejemplo de regulación por control de la estabilidad del mensajero está dado por las histonas. Fuera de las divisiones celulares, la duración de vida de los mensajeros de histonas es

muy débil para poder estimarse. Durante la división, su duración de vida es de alrededor de 15 a 60 minutos. Si la replicación del ADN está bloqueada por inhibidores, la duración de vida de los mensajeros de histona se derrumba. La síntesis de histonas está, por tanto, estrechamente acoplada a la replicación del ADN, teniendo por efecto una perfecta adecuación entre la cantidad de histonas fabricadas y la del ADN sintetizado. La regulación de la estabilidad de los mensajeros de histonas pone en juego una estructura especial, la de horquilla, situada en el extremo 3' de los ARNm. La delección de esta estructura conlleva una estabilización de los mensajeros y su acoplamiento a un mensajero estable lo desestabiliza.

Se han propuesto varios mecanismos moleculares para explicar la disminución de la duración de la vida de los mensajeros. Una región rica en AU en la porción 3' del mensajero podría ser la diana para la fijación de una proteína que pudiera provocar un acortamiento de la cola poli A, la cual se sabe que juega un importante rol estabilizador en los mensajeros. Los ARNm de las histonas no son poliadenilados, pero la estructura en horquilla que poseen en 3' podría interactuar con el ribosoma al cual se asocia una actividad 3' exonucleasa susceptible de destruir el ARN.

El almacenamiento de los ARNm, tanto en el núcleo como en el citoplasma, es un medio de regulación. Numerosos genes son transcritos y jamás aparecen sus productos de traducción, aunque no se conoce en profundidad cómo se decide ese almacenamiento y cuáles son los mecanismos que lo rigen.

Silenciamiento génico por ARNs pequeños

En los organismos eucariotas superiores existe una clase de pequeños ARNs cuya función es silenciar genes, ya sea por degradación o evitando la traducción. Este mecanismo es una regulación fina de la expresión y es mucho menos demandante que regular la transcripción en sí.

Los que más se estudiaron son los **microARN**: el mecanismo empieza con la síntesis de un pri-miARN en el núcleo celular, que es procesado por una proteína llamada “microprocessor” y se forman los pre-miARN o HAIRPIN. Estos son exportados al citoplasma donde la enzima DICER los corta en pequeños fragmentos doble cadena que se unen con proteínas pertenecientes a la familia de las proteínas *Argonata*. Estos fragmentos se acoplan con el complejo RISC (proteínas argonautas Ago) y por medio de una actividad similar a una helicasa asignada al complejo, desenrolla la doble hélice del ARNsi quedándose con la hebra antisentido o guía. Este complejo es el que va a unirse al ARNm blanco produciendo el silenciamiento (Figura 5).

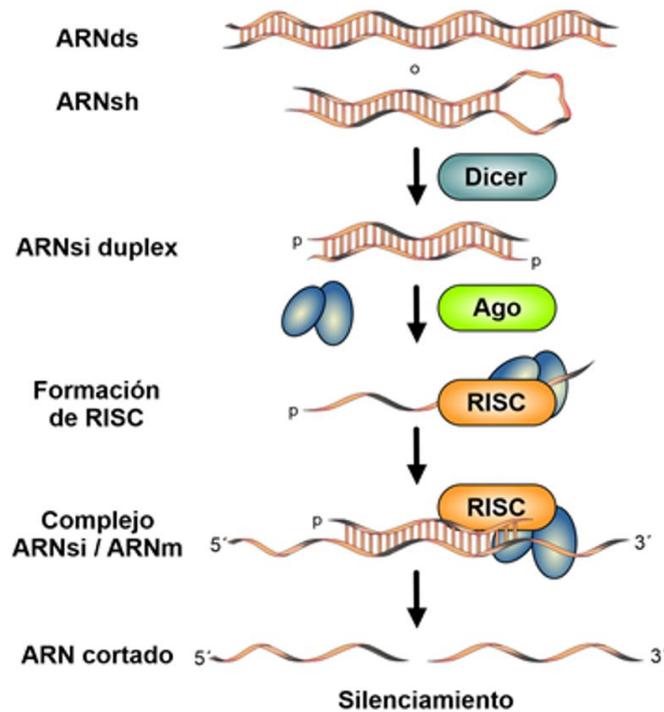


Figura 2.5. Silenciamiento génico por ARN pequeños.

Nivel traduccional

Este nivel de regulación es el menos conocido de todos. Un mecanismo de regulación del **inicio de la traducción** en eucariotas involucra la unión de proteínas citoplasmáticas a sitios específicos del ARNm. Un ejemplo de ello es lo que sucede en la traducción de las proteínas ferritina y el receptor de transferrina. La ferritina es una proteína involucrada en el almacenamiento intracelular del hierro, mientras que el receptor de transferrina se une a la proteína transferrina quien es la responsable de transportar este metal en la sangre. Ambos ARNm poseen una secuencia de aproximadamente 30 nucleótidos llamada *elemento de respuesta al hierro* (iron responsive element: IRE). En el ARNm que codifica la ferritina el IRE se ubica hacia el extremo 5', mientras que en el ARNm que codifica el receptor de transferrina el IRE se ubica hacia el extremo 3'. Cuando los niveles de hierro son bajos, la aconitasa citosólica se une a los IRE. Esta unión en el extremo 5' del ARNm de la ferritina impide el ensamblaje de la maquinaria para la traducción impidiendo que se produzca más proteína. Por el contrario, la unión de la aconitasa en el extremo 3' del ARNm del receptor de transferrina lo desestabiliza, debido a que posee una secuencia desestabilizadora rica en AU, y favorece la traducción de esta proteína. Si la concentración de hierro aumenta, este metal se une a la aconitasa haciendo que cambie de conformación, liberando al IRE. De esta manera se induce la traducción del ARNm de la transferrina y se impide la del receptor de transferrina, ya que es rápidamente degradado.

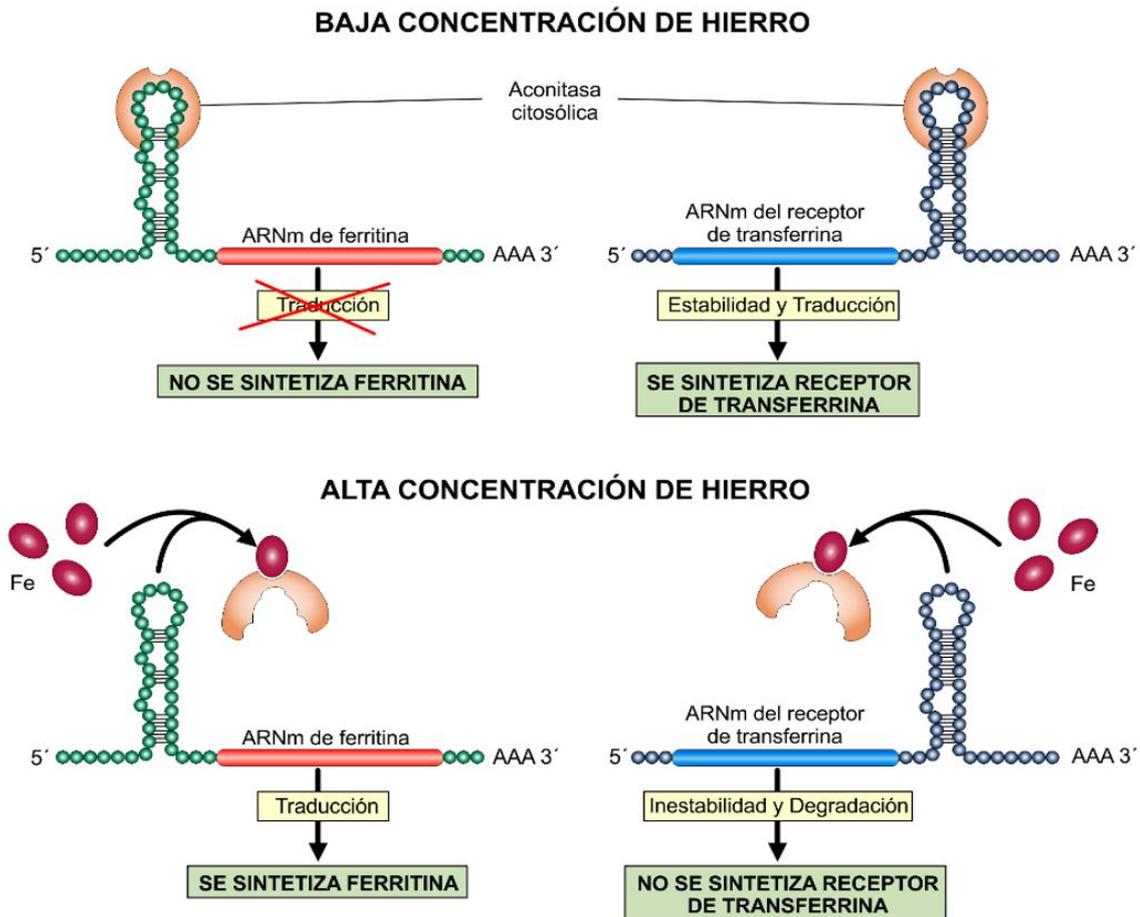


Figura 2.6. Regulación de la traducción de los ARNm que codifican para las proteínas ferritina y receptor de transferrina.

Algunas proteínas de unión al ARNm también pueden regular la traducción de otros ARNm, por ejemplo, la hormona prolactina se une y estabiliza al ARNm que codifica la caseína, mientras que en su ausencia éste es degradado.

Otro mecanismo de regulación de la traducción es la degradación mediada por mutaciones sin sentido, en donde se degradan los ARNm en los que uno o más exones han sido cortados y empalmados de manera incorrecta. En la mayoría de los ARNm con corte y empalme de exones correcto, el codón de terminación se encuentra en el exón final. Cuando el proceso de corte y empalme es defectuoso se modifica el marco de lectura y puede generarse un codón de stop dentro del gen. Esto último desencadena la rápida degradación del ARNm debido a la presencia de uno o más complejos de la unión de exones (EJC). EJC es un complejo proteico que se une aguas arriba de una unión exón-exón, durante el splicing. La presencia de EJC funciona como un mecanismo de control de calidad celular en el que el ribosoma juega un papel esencial, escaneando el ARNm en sentido 5'-3' y retirando los complejos. Si el ribosoma se desensambla por el reconocimiento de un codón de stop prematuro, implica que uno o más EJC no sean retirados, hecho que desencadenará la degradación del ARNm por la vía de *degradación mediada por mutaciones sin sentido*. Esto ocurre por ejemplo en los pacientes con talasemia β^0 . Las personas que tienen talasemia β^0 expresan muy poco β -globina. Muchas veces, la baja expresión de β -globina se debe a la delección de un único par de bases en el

exón 1 o 2 del gen que codifica esta proteína. Cuando los ribosomas traducen el ARNm mutado encuentran un codón de stop dentro del gen como resultado de la delección. En consecuencia, no se traduce la última unión entre exones del ARNm y no elimina el complejo EJC promoviendo la degradación del ARNm.

La hidrólisis de un GTP a GDP en el factor de iniciación de la traducción eIF2 (*eukaryotic initiation factor 2*) también se considera un mecanismo de regulación de la traducción. La proteína eIF2 es una proteína G trimérica y, como todas las proteínas G, puede tener asociado un GTP o un GDP. Cuando eIF2 tiene unido un GTP es capaz de reclutar a un ARNt iniciador cargado con el aminoácido metionina y asociarse con la subunidad ribosómica pequeña. Luego, el factor de iniciación de la traducción eIF2 junto con el ARNt cargado y la subunidad ribosómica menor se unen al ARNm para buscar, en dirección 3', el codón AUG (inicio de la traducción). Cuando se aparean el ARNt con AUG, el GTP ubicado en eIF2 es hidrolizado a GDP liberando al complejo eIF2-GDP.

Finalmente, la concentración citoplasmática de los ARNt y la concentración de las subunidades ribosomales para formar los polirribosomas también son mecanismos fundamentales que regulan la expresión génica a nivel traduccional.

Nivel post-traduccional

Las proteínas recién sintetizadas pueden sufrir modificaciones postraduccionales que son, a su vez, una manera de controlar la expresión de los genes en eucariotas. Esta regulación puede ser cuantitativa o cualitativa. Se trata de glicosilaciones, fosforilaciones, acetilaciones, ribosilaciones, etc. Muchas de las proteínas que las células secretan suelen incorporar una serie de aminoácidos hidrofóbicos en su extremo N-terminal. Esta prolongación, llamada **péptido señal**, funciona como una señal que envía a las proteínas hacia el retículo endoplásmico durante la traducción. Cuando esta secuencia sale del ribosoma, un complejo proteico llamado partícula de reconocimiento de señal (SRP) la reconoce y lleva al ribosoma hacia el retículo endoplásmico. Ahí el ribosoma facilita la entrada de la cadena de aminoácidos hacia el lumen (interior) del RE conforme se produce. Otras proteínas se sintetizan como precursores inactivos que deben ser clivados para generar proteínas activas. Ejemplos de ello son, entre otros, las caspasas que se sintetizan como pro-caspasas inactivas, las hormonas insulina y glucagón y las enzimas tripsina y quimotripsina.

Comparación de la regulación génica en Procariotas y Eucariotas

En la tabla 1 se destacan las principales diferencias entre la regulación génica de organismos procariotas y eucariotas.

Tabla 1. Diferencias entre procariotas y eucariotas en cuanto a mecanismos de regulación de la expresión génica

PROCARIOTAS	EUCARIOTAS
ADN con bajo grado de empaquetamiento. No hay regulación a nivel cromatina	ADN altamente empaquetado, asociado a histonas. Regulación por condensación/descondensación de cromatina
ADN disponible para la transcripción.	Regiones o zonas con ADN metilado. La metilación provoca represión de la expresión génica
Los genes pueden encontrarse en operones con un único promotor. Sistemas inducibles y represibles	Cada gen tiene su propio promotor. Presencia de enhancers y elementos regulatorios en cis y trans
Transcripción y traducción ocurren de manera acoplada en el citoplasma celular.	Transcripción y traducción están separados física y temporalmente. Ambos participan de la regulación de la expresión génica
ARNm policistrónicos	ARNm monocistrónicos
ARNm no se procesa	ARNm se procesa (regiones 5' y 3' UTR, splicing diferencial). Diferencias en el procesamiento regula la estabilidad y la expresión del ARNm
No existe transporte ni almacenamiento de ARNm	Transporte y almacenamiento de ARNm alteran su expresión
La traducción no se regula	La traducción puede ser regulada
No hay modificación postraducciona de proteínas	Las proteínas recién sintetizadas pueden sufrir modificaciones postraduccionales

Ejercicios

Regulación génica en procariotas

Se han estudiado diferentes cepas de *Escherichia coli*, en las cuales el gen A de la proteína represora, la región operadora B y el gen C que codifica la enzima, son necesarios para la expresión de un sistema inducible de control negativo. Cada una de estas cepas presenta mutaciones en alguno de estos genes. También se han analizado diploides parciales que poseen un plásmido F', el cual contiene información correspondiente al sistema enzimático bajo análisis. Complete la siguiente tabla determinando si se producirá (+) o no (-) la síntesis de la enzima en cada una de las cepas bacterianas estudiadas, en presencia y en ausencia del inductor.

		Producción de Enzima	
	Cepa bacteriana	inductor presente	inductor ausente
1)	A ⁺ B ⁺ C ⁺		
2)	A ⁻ B ⁺ C ⁺		
3)	A ⁺ B ⁻ C ⁺		
4)	A ⁺ B ⁺ C ⁻		
5)	A ⁻ B ⁺ C ⁺ / F' A ⁺ B ⁻ C ⁻		
6)	A ⁺ B ⁺ C ⁻ / F' A ⁻ B ⁻ C ⁺		

Resolución: 1) En esta cepa no hay mutaciones presentes, por lo tanto el sistema funcionará normalmente, habrá producción de enzima en presencia del inductor y no habrá producción de enzima en ausencia de inductor.

2) En esta cepa el gen que codifica la proteína represora está mutado. Como consecuencia, no se producirá la proteína represora y por lo tanto no se podrá reprimir el sistema. Habrá producción de enzima tanto en presencia como en ausencia de inductor.

3) En la cepa 3 se encuentra mutado el operador. Una mutación en esta secuencia provocará que la proteína represora no reconozca esta región y no se una a ella. Habrá una síntesis constitutiva de la enzima, esto quiere decir que habrá producción de enzima tanto en presencia como en ausencia de inductor.

4) En esta cepa existe una mutación en el gen que codifica la enzima. Si bien la regulación del sistema funciona normalmente, no habrá producción de enzima estando o no presente el inductor.

5) En esta cepa, merodiploide, encontramos dos mutaciones presentes en el plásmido, una en el operador y otra en el gen de la enzima. Como consecuencia de estas mutaciones no hay producción de enzima por parte del plásmido. En el cromosoma bacteriano el operón posee una mutación en el gen de la proteína represora. Al ser el represor un elemento que actúa en trans, esta mutación puede ser salvada por la copia normal del gen que está presente en el plásmido. Como consecuencia, todo el sistema va a funcionar normalmente y habrá producción de enzima en presencia de inductor y no habrá producción en ausencia del mismo. En este caso la mutación en el gen del represor es recesiva con respecto a la copia normal del gen.

6) En el caso de esta cepa, también merodiploide, la mutación presente en el gen que codifica la enzima en el cromosoma bacteriano, tiene como resultado el que no haya producción de la enzima por parte del operón. Sin embargo, como consecuencia de la mutación en el operador del plásmido, este sistema va a presentar una síntesis constitutiva de la enzima. El operador es un elemento que actúa en cis y una mutación en esta región es dominante y no puede ser sal-

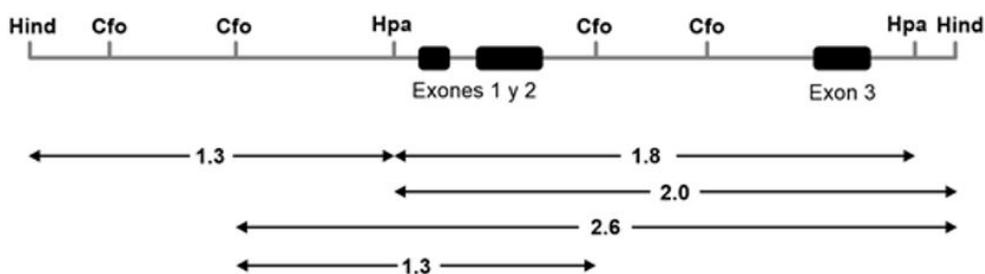
vada por una copia normal del operador. Como resultado, el sistema en su conjunto va a presentar síntesis constitutiva de la enzima.

Regulación génica en eucariotas

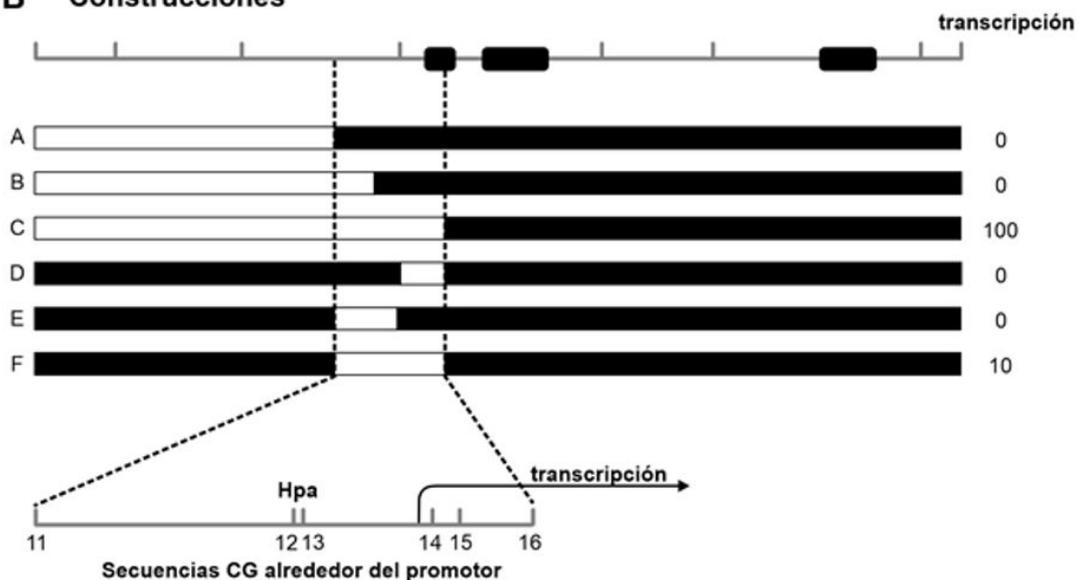
Para estudiar el rol de la metilación del ADN en el control de la expresión génica se utilizó el gen de la β -globina humana como sistema de ensayo. Al introducir este gen humano en el genoma de fibroblastos de ratón puede detectarse el ARNm correspondiente. Sin embargo, si el gen es metilado en sus 27 sitios CG, la expresión es bloqueada completamente. Para decidir si existe un sitio crítico de metilación suficiente para determinar la expresión de globina se generaron, por ingeniería genética, varias construcciones que están metiladas en diferentes regiones del gen.

La siguiente figura muestra las construcciones donde las regiones metiladas se indican en negro. La disposición de los seis sitios de metilación alrededor del promotor se muestra debajo. Los sitios 11, 12 y 13 no están metilados en las construcciones B y E. Los sitios 14, 15 y 16 están metilados en la D. En la construcción F ninguno de los seis sitios está metilado.

A Mapa de restricción



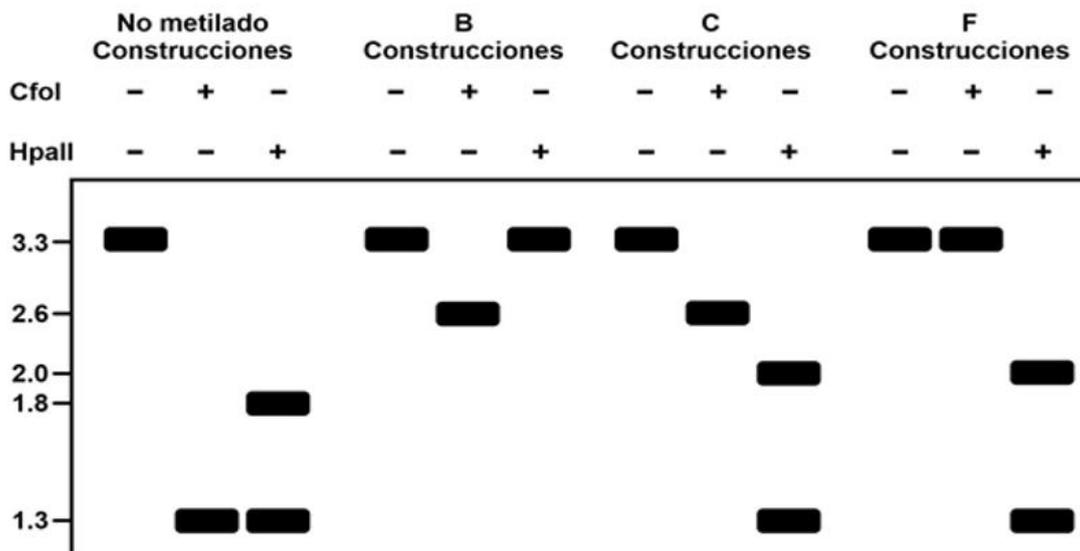
B Construcciones



Estas construcciones se incorporaron en los fibroblastos de ratón y se midió la síntesis de ARNm de β -globina humana. A la derecha de la figura se indican los valores obtenidos para cada construcción relativa a la línea celular que contiene la construcción no metilada.

A) ¿Puede afirmarse que la síntesis de ARN de β -globina humana depende de un único sitio crítico de metilación para determinar la expresión genética? Explique.

Resolución A: Los resultados de la construcción A indican que cuando los sitios 11-27 están metilados y no hay transcripción, o sea que sólo con los sitios 1-10 activos no se puede llevar a cabo la transcripción. La construcción B tiene activos los sitios 1-13 y tampoco se detectó síntesis de ARNm, demostrando que se necesitan otros sitios activos para llevar a cabo la transcripción. Contrariamente, en la construcción C, que posee los sitios 1-16 no metilados (activos), se observa un 100 de transcripción. Según los resultados presentados hasta el momento podría pensarse que los sitios críticos para la transcripción están entre el 11-16. Esta región se analizó con más detalle en las construcciones D y E, donde se dejaron activos sólo los sitios 14-16 y 11-13 respectivamente. Sin embargo, ninguna de estas construcciones fue capaz de activar la síntesis de ARNm. Por último, en la construcción F se metilaron los sitios 1-10 y 17-27, dejándose activos sólo los sitios 11-16. Se observó que esta construcción es capaz de llevar a cabo la síntesis de ARNm, pero en un porcentaje mucho menor. Es decir que no existe un único sitio crítico que determine la expresión de β -globina humana, si no que ésta depende de que se encuentren activos varios sitios entre el 1 y el 16.



Para confirmar si los patrones de metilación fueron heredados correctamente, se aislaron muestras de ADN de las líneas celulares conteniendo las construcciones B, C y F y se digirieron con las enzimas de restricción HindIII más CfoI o HpaII. Las enzimas CfoI y HpaII no digieren el ADN si los sitios de reconocimiento están metilados. Los fragmentos de ADN se separa-

ron mediante electroforesis en gel y se visualizaron mediante hibridación con una sonda radiactiva correspondiente al fragmento HindIII (Figura 2)

B) A partir de los patrones de restricción obtenidos, ¿puede concluirse que las secuencias CG que fueron metiladas durante su creación se mantuvieron en la célula?

Resolución B: Cuando se corta la construcción no metilada sólo con HindIII se espera obtener una única banda de 3.3 kpb según el mapa de restricción. Esta construcción posee 4 sitios de restricción para CfoI, lo cual resultaría en 5 fragmentos de restricción, sin embargo, sólo el más grande de ellos (1.3kpb), podrá ser detectado en la electroforesis en gel que se realizó, ya que en el gel se ven bandas entre 1.3 y 3.3 kpb. Al digerir la misma construcción no metilada con HpaII se obtendrán 3 fragmentos de restricción, uno de 1.3 kpb, otro de 1.7 kpb y un tercero más pequeño que tampoco se podrá observar en el gel realizado.

Se espera que las construcciones generadas presenten los mismos sitios de restricción para HindII y que varíen sus patrones de digestión para CfoI y HpaII según cuáles sitios están metilados.

En la construcción B sólo quedan sin metilar los dos primeros sitios de restricción de CfoI, por lo cual esta enzima generará 3 fragmentos, dos pequeños que no se detectarán en el gel y uno grande que tendrá un tamaño de 2.6 kpb, ya que abarca desde el segundo sitio de restricción hasta el final de la construcción. En cambio, todos los sitios de HpaII estarán metilados en esta construcción y se espera obtener un patrón igual al de HindIII.

En la construcción C quedan sin metilar los dos primeros sitios de restricción de CfoI y sólo uno de HpaII. Por lo tanto, para la primera enzima se espera obtener el mismo patrón que en el caso anterior (construcción B), mientras que se espera que la digestión con HpaII de cómo resultados 2 fragmentos: uno de 1.3 kpb y otro de 2 kpb.

Finalmente, la construcción F tiene todos los sitios de CfoI metilados, por lo que se espera que la digestión con esta enzima presente el mismo patrón que HindIII. Para HpaII hay sólo un sitio de restricción sin metilar y se espera que la digestión resulte en dos fragmentos de 1.3 y 2.0 kpb.

Dado que todos los patrones esperados coinciden con lo que se observa en el gel de electroforesis puede concluirse que las secuencias CG que fueron metiladas durante su creación se mantuvieron tal cual en la célula.

Referencias

- Barbosa, C., Peixeiro, I., & Romão, L. (2013). Gene Expression Regulation by Upstream Open Reading Frames and Human Disease. *PLoS Genet.* 9, 1–12. doi:10.1371/journal.pgen.1003529.
- Boehm V. & Gehring N. H. (2016). Exon Junction Complexes: Supervising the Gene Expression Assembly Line. *Trends Genet.*, 32(11):724-735. doi: 10.1016/j.tig.2016.09.003.

- Brown, T. (2008). *Genomas*. 3ra Edición. Editorial Panamericana, Buenos Aires.
- Blakey, C. A., & Litt, M. D. (2015). Epigenetic gene expression—an introduction. In *Epigenetic Gene Expression and Regulation*. Academic Press, pp. 1-19.
- Conway, R. C. & Conway, J. W. Eds. (1994). *Transcription: Mechanisms and regulation*. Raven Press, New York.
- Griffiths, A. J. F., Lewontin, R. C., Carroll, S. B. & Wessler, S. R. (2008). *Genética*. Editorial Mc Graw Hill, Madrid.
- Kaplan, J. C. & Delpech, M. (1993). *Biologie Moléculaire et Médecine*. 2e édition. Editorial Flammarion Médecines-Sciences, Paris.
- Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., Palladino, M. A. & Killian, D. (2019). *Concepts of genetics*. Twelfth edition. Pearson Education Limited, London.
- Landes, E. S., & Schork, N. J. (1994). Genetic dissection of complex traits. *Science* 265, 355–356. doi:10.1038/ng0496-355.
- Lewin, B. (2000). *Genes VII*. 5ta Edición. Editorial Oxford University Press. Oxford.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell, J. (2005). *Biología Celular & Molecular*. 5ta Edición. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Matoulkova, E., Michalova, E., Vojtesek, B., & Hrstka, R. (2012). The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells. *RNA Biol.* 9, 563–576. doi:10.4161/rna.20231.
- Meyers, R. A. (2012). *Epigenetic Regulation and Epigenomics*. Editorial Wiley-VCH Verlag GmbH. Weinheim, Alemania.
- Pierce, B. A. (2003). *Genetics: a Conceptual Approach*. Editorial W.H. Freeman and Company, New York.
- Ramos Morales, P. (1993). *Manual de laboratorio de genética para Drosophila melanogaster*, McGraw-Hill Interamericana de México.
- Rosengren Pielberg, G., Golovko, A., Sundström, E., Curik, I., Lennartsson, J., Seltenhammer, M. H., *et al.* (2008). A cis-acting regulatory mutation causes premature hair graying and susceptibility to melanoma in the horse. *Nat. Genet.* 40, 1004–1009. doi:10.1038/ng.185.
- Strickberger M. W. (1988). *Genética*. 3ra Edición. Editorial Omega, Barcelona.
- Stryer, L., Berg, J.M. & Tymoczko, J. L. (2003). *Bioquímica*. 5ta. Edición. Editorial Reverté. Barcelona.
- Suzuki D. T., Griffiths A. J. F., Millar J. H., Lewontin R. C. (1994). *Introducción al análisis genético*. Editorial Interamericana. McGraw-Hill.

CAPÍTULO 3

Introducción a la Citogenética

Noelia Nikoloff y Celeste Ruiz de Arcaute

Estructura, función y comportamiento cromosómico

La citogenética es la rama de la genética que estudia la estructura, número, morfología y comportamiento del ADN que se condensa durante la división celular, con participación de proteínas para formar los cromosomas. Esta ciencia surgió a comienzos del siglo XX para explicar las leyes de Mendel mediante el comportamiento cromosómico por fusión de dos disciplinas, la citología y la genética, heredando de la primera los aspectos cualitativos, físicos y descriptivos, y de la segunda los enfoques cuantitativos y fisiológicos. Desde ese entonces, se ha avanzado en el desarrollo de técnicas y metodologías que brindan valiosos aportes en la resolución de problemas diagnósticos, taxonómicos y evolutivos, entre tantos otros, de diversos grupos animales y vegetales. Adicionalmente, estas tecnologías son ampliamente utilizadas en medicina y, mediante el análisis de tejidos, sangre o médula ósea, se identifican cambios en los cromosomas, como cromosomas rotos, faltantes o adicionales, cambios que pueden ser signo de una enfermedad genética, o de algunos tipos de cáncer. En el presente capítulo se abordará la estructura, función y comportamiento de los cromosomas junto con las anormalidades que pueden presentar.

Un poco de historia

Los cromosomas fueron observados por primera vez en 1842 por el botánico Wilhelm von Nägeli en células vegetales, e independientemente por Edouard Van Beneden en nematodos. En 1882 Walther Flemming publicó las primeras ilustraciones de cromosomas humanos, usando tintes de anilina. Además, estudió el proceso de división celular y la distribución de los cromosomas en el núcleo hermano, proceso que denominó mitosis. En 1888, Gottfried Waldeyer introdujo la palabra cromosoma, proveniente del griego cuyo significado es “cuerpo coloreado”. Sin embargo, una de las contribuciones más importantes para esta disciplina fue hecha por Walter Sutton y Theodor Boveri en 1903 quienes postularon la teoría cromosómica de la herencia, refiriéndose a la localización de los genes en los cromosomas. Luego, Thomas H. Morgan y colaboradores estudiando a *Drosophila melanogaster* sentaron las bases experimentales de

esta teoría, marcando una etapa fundamental para el nacimiento de la citogenética como ciencia independiente.

Durante el siglo XX el mejoramiento de las lentes ópticas, las técnicas de tinción y la mejora en la manipulación de tejidos ayudó a la citogenética a continuar avanzando. En 1924 Levitsky propuso el término cariotipo para referirse al posicionamiento ordenado de los cromosomas. En 1953 James Watson y Francis Crick descubrieron la estructura de la molécula del ADN, dando el primer paso en el conocimiento y el posterior estudio del genoma humano. En el año 1956 Tjio y Levan determinaron el número y estructura de los cromosomas humanos y establecieron lo que hoy en día se conoce como $2n=46$. A partir de este momento, las técnicas para la caracterización del cariotipo humano iniciaron un continuo desarrollo en cuanto a su poder de resolución y eficacia.

En 1959 Jérôme Lejeune confirmó que el síndrome de Down (trisomía del cromosoma 21) era consecuencia de una aberración cromosómica, idea que se venía estudiando desde 1932 por Petrus Johannes Waardenburg. También en ese año, se describieron otros síndromes cromosómicos que contribuyeron a la hipótesis de la existencia de cromosomas sexuales: el Síndrome de Turner, presente solo en el sexo femenino, donde hay ausencia total o parcial de un cromosoma X, y el Síndrome de Klinefelter (XXY). Estos hallazgos dieron lugar al descubrimiento de muchos otros síndromes cromosómicos a lo largo de los años.

En 1968 Torbjörn Caspersson, observó que al teñir cromosomas de plantas con quinacrina fluorescente no se coloreaba de manera homogénea todo el cromosoma, sino que producía zonas brillosas y zonas oscuras. Así, se postuló que la quinacrina se une preferencialmente a los residuos de guanina en zonas ricas en G-C produciendo “estriaciones” brillantes. Más adelante, en el año 1971, se desarrollaron técnicas de tinción cromosómica que se basaban en el uso de álcali, pretratamiento salino y tinción de Giemsa, cuyo resultado eran patrones de bandas claras y oscuras (o fluorescentes y no fluorescentes). Esas bandas siguen distintos patrones en cromosomas no homólogos y son iguales solo en cada pareja de cromosomas paterno y materno (aquellos homólogos entre sí). Así surgieron una serie de diferentes tipos de bandeos cromosómicos para uso diagnóstico y/o confirmación de ciertos tipos de alteraciones cromosómicas.

La investigación y el enfoque cromosómico de la citotaxonomía y la evolución han progresado en forma permanente. Desde la última mitad del siglo XX se ha producido un espectacular progreso en el conocimiento sobre el material genético, se han caracterizado los cromosomas y se ha identificado la secuencia completa del genoma de muchas especies. Principalmente en el humano, se han relacionado un gran número de alteraciones de la estructura y secuencia del ADN con todo tipo de enfermedades, tanto hereditarias como no hereditarias (especialmente asociadas a cáncer). Este desarrollo ha venido acompañado por una gran cantidad de técnicas para su estudio, muchas de las cuales se han trasladado a la investigación y la caracterización de la carga genética de los seres humanos, y a su aplicación en la práctica clínica para el diagnóstico de ciertas patologías. Ello ha generado que, además de los estudios moleculares al nivel de identificación de la mutación de un gen, la citogenética convencional se haya ampliado

a la detección de alteraciones extremadamente pequeñas de la estructura del cromosoma, dando lugar a una nueva área de diagnóstico denominada citogenética molecular.

Cromatina y Cromosomas

En general, los genomas de los eucariotas son más complejos y el ADN se encuentra organizado de forma diferente al de los procariotas. Casi siempre los genomas procariotas contienen cromosomas únicos que normalmente son moléculas circulares. En cambio, los genomas de los eucariotas están compuestos de múltiples cromosomas, cada uno de los cuales contiene una molécula de ADN lineal (Teoría Uninémica) y a pesar de variar el número según la especie, su estructura básica es la misma.

La cromatina, que se encuentra formada por complejos de ADN, ARN, proteínas histónicas y no histónicas, luego de un proceso de compactación forma los cromosomas, visibles sólo durante la división celular. Las proteínas histonas tienen gran cantidad de aminoácidos como arginina y lisina que aportan carga positiva y facilitan su unión al ADN cargado negativamente. Existen 5 tipos importantes de histonas: H1, H2A, H2B, H3 y H4 (Tabla 3.1). Una característica común de todas ellas, en especial la H3 y H4, es que son proteínas conservadas evolutivamente. Adicionalmente, las proteínas no histónicas, denominadas *High-Mobility Group* o HMG (grupo de alta movilidad electroforética) participan en la conformación de la estructura superior de la cromatina y en el control de la expresión génica.

Tabla 3.1. Tipos de histonas y características de su composición.

Histonas	Características	Nº de aminoácidos	% de aminoácidos básicos
H1	Rica en lys	213	30
H2A	Rica en lys y arg	129	30
H2B	Medianamente rica en arg	125	24
H3	Rica en arg	135	24
H4	Rica en arg y gly	102	27

La cromatina puede ser principalmente de dos tipos: eucromatina y heterocromatina, esta última a su vez puede ser constitutiva o facultativa. La eucromatina se encuentra sin condensar y distribuida por todo el núcleo en las células en interfase. Durante este periodo los genes se transcriben y el ADN se replica. Alrededor del 10% de la eucromatina que contiene los genes que son transcritos activamente se encuentra en un estado de menor condensación. La condición heterocromática de una región cromosómica se evidencia por la heteropícnosis positiva o

negativa, que se refiere a la tinción mayor o menor, respectivamente, en comparación con la eucromatina. La heterocromatina constitutiva es transcripcionalmente inactiva y contiene secuencias de ADN altamente repetitivas, como aquellas presentes en centrómeros y telómeros. Su condición heterocromática se manifiesta siempre, tanto en interfase como en la división celular. La heterocromatina facultativa corresponde a las zonas que se transcriben según tipo y estado celular, contiene información sobre todos aquellos genes que no se expresan o que pueden expresarse en algún momento, por lo tanto, son zonas que se compactan o descompactan según haga falta su transcripción como por ejemplo el cromosoma X inactivo o corpúsculo de Barr (éste se presenta en las células de las hembras de mamíferos y la inactivación de uno de los cromosomas X es al azar).

La condensación de la cromatina varía a lo largo del ciclo celular. Así, durante el periodo interfásico la mayoría se encuentra sin condensar y distribuida en todo el núcleo, mientras que en la metafase de la mitosis o meiosis alcanza su grado de compactación máxima en forma de cromosomas para luego ser distribuidos a las células hijas, tomando la forma clásica con que se grafican los cromosomas.

El primer grado de compactación está dado por el propio enrollamiento de la doble hélice de ADN (2 nm). Posteriormente, se forma una fibra de 10 nm de diámetro que recuerda a un collar de perlas. Estas cuentas reciben el nombre de nucleosomas y están constituidos por un octámero de proteínas histonas y ADN. Los nucleosomas están unidos entre sí por un segmento de ADN llamado ADN lazo o *linker* el cual varía de 10 a 80 pb de longitud dependiendo de la especie. Cada nucleosoma contiene alrededor de 146 pares de bases de ADN enrolladas 1,65 veces alrededor de un corazón de histonas (H2A, H2B, H3 y H4), mientras que la histona H1 se encuentra unida a este complejo por fuera del mismo y dando estabilidad a éste. La cromatina se puede condensar aún más enrollándose en fibras de 30 nm llamadas solenoides (estructura similar a un resorte), en el cual las histonas H1 interactúan para lograr este segundo nivel de compactación. Posteriormente, los solenoides forman bucles que se anclan a un esqueleto central de proteínas no histónicas y forman una fibra de 300 nm. Seis bucles forman una estructura retorcida llamada roseta y varias rosetas forman un rodillo. Finalmente, una sucesión de rodillos constituye una fibra de 700 nm, el cromosoma (Figura 3.1).

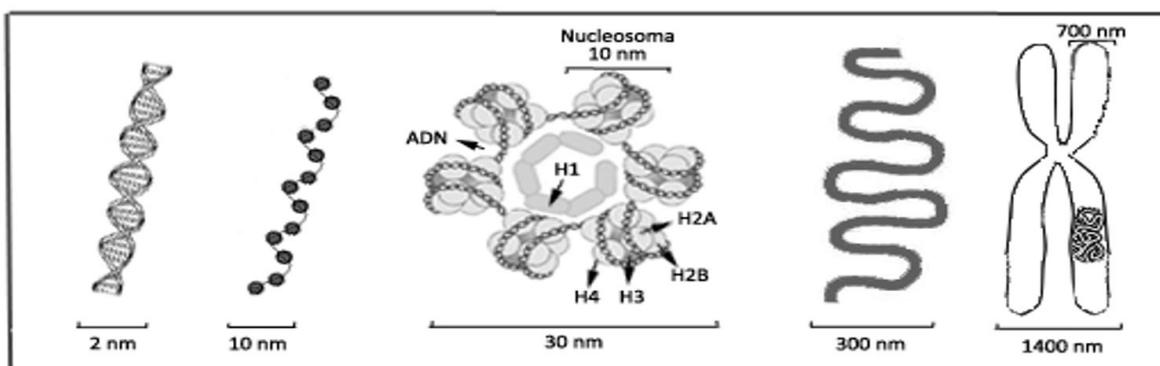


Figura 3.1. Representación esquemática de las distintas etapas de la compactación del ADN.

Cromosoma: Estructura y función

Los cromosomas se observan durante la metafase, como mencionamos anteriormente, y se observan constituidos por dos cromátidas idénticas o cromátidas hermanas, producidas por duplicación en el periodo replicativo del ADN durante la interfase (período S). A su vez, en estos se puede identificar un brazo corto y otro largo, denominados por convención p y q , respectivamente, que se encuentran separados por el centrómero o constricción primaria, la región más estrecha del mismo (Figura 3.2). El centrómero es una región especializada y parte integral del cromosoma, donde se unen las cromátidas hermanas y se encuentra una estructura proteica llamada cinetocoro, donde se une el huso mitótico. En su estructura intervienen tanto proteínas centroméricas como ADN centromérico, el cual se organiza en forma de heterocromatina constitutiva, con regiones pobres en genes y condensado en casi todas las células somáticas de un organismo. Es esencial para el movimiento y segregación normal del cromosoma durante las fases de la mitosis y meiosis, ya que los fragmentos cromosómicos que no poseen centrómero no se unen al huso mitótico y no son incluidos en los núcleos de las células hijas. Posee un comportamiento diferente en la mitosis y en la meiosis. En la anafase mitótica y anafase-II meiótica, las cromátidas hermanas se separan a polos opuestos (*segregación anfitélica*); mientras que en la anafase-I de la meiosis, migran a polos opuestos los cromosomas homólogos completos, cada uno constituido por dos cromátidas hermanas (*segregación sintélica*).

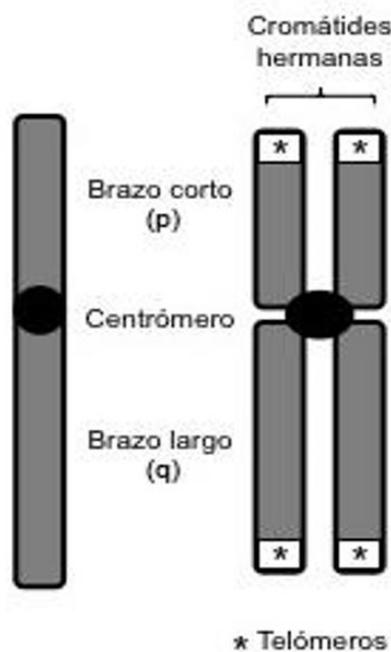


Figura 3.2. Estructura cromosómica. * Telómeros

En el proceso de división celular, al centrómero se le une el cinetocoro, que como mencionamos es una estructura proteica ensamblada sobre nucleosomas centroméricos que contienen una forma especializada de histona H3. Los cinetocoros de las células animales pueden

subdividirse en dos regiones, el *cinetocoro interno*, el cual se organiza sobre secuencias de ADN altamente repetido (ADN satélite, rico en AT) y se ensambla en una forma especializada de cromatina que persiste a través del ciclo celular; y el *cinetocoro externo*, el cual posee distintos componentes proteicos dinámicos que se ensamblan durante la división celular. Cuando la inserción de las fibras del huso está restringida a un segmento pequeño del cromosoma, se lo denomina centrómero *localizado*, mientras que si la inserción se realiza sobre toda la extensión del cromosoma, se lo denomina *difuso*. Este último tipo, aunque raro, se ha encontrado en plantas, hongos, algas, musgos y algunos animales como homópteros y heterópteros. Aunque lo normal es que los cromosomas sean monocéntricos, se pueden originar cromosomas dicéntricos como consecuencia de una translocación recíproca asimétrica o una translocación robertsoniana (ver sección *Cambios cromosómicos estructurales*).

Los telómeros son regiones de ADN no codificante, ubicados en los extremos de los cromosomas. No se distinguen de manera visible de otras partes del cromosoma. Están formados por secuencias simples de 100 a 300 kb que contienen grupos de residuos G (en seres humanos, el hexanucleótido TTAGGG). Cumplen importantes funciones, como conservar la integridad del cromosoma (cuando se pierde un telómero, el cromosoma se vuelve inestable, “pegajoso”, y puede fusionarse con los extremos de otros cromosomas rotos y formar anillos -ver sección Alteraciones Cromosómicas-, o degradarse), asegurar la replicación del cromosoma y el mantenimiento de la proliferación celular. Asimismo, ayudan a prevenir la proliferación ilimitada. En cada división celular, los telómeros se acortan de 50 a 100 nucleótidos. La enzima telomerasa es la encargada de mantener la longitud de los mismos (ver capítulo de Citogenética Aplicada para profundizar el concepto de telómeros).

Los cromosomas metafásicos se clasifican de acuerdo a la longitud de los brazos corto (*p*) y largo (*q*), así como por la posición del centrómero en (Figura 3.3):

- **Metacéntricos:** el centrómero se ubica en una posición central, dejando los brazos corto y largo de la misma longitud.
- **Submetacéntricos:** el centrómero se encuentra más próximo a uno de los extremos, siendo el brazo *p* de menor longitud que el brazo *q*.
- **Acrocéntricos:** el centrómero se encuentra cerca de la parte superior del cromosoma, con el brazo corto muy pequeño. Con frecuencia poseen constricciones secundarias en los brazos cortos, formando tallos y satélites. Los tallos contienen genes que codifican ARN ribosómicos.
- **Sub-telocéntricos:** poseen el centrómero ubicado muy próximo a uno de los extremos, dejando diminuto al brazo *p*. No son muy frecuentes.
- **Telocéntricos:** poseen el centrómero ubicado en posición terminal.
- **Holocéntricos u Holocinéticos:** Son cromosomas que carecen de un centrómero localizado. Presentes en muchos invertebrados como nematodos, lepidópteros y escorpiones. También, se encuentran en plantas y protistas.

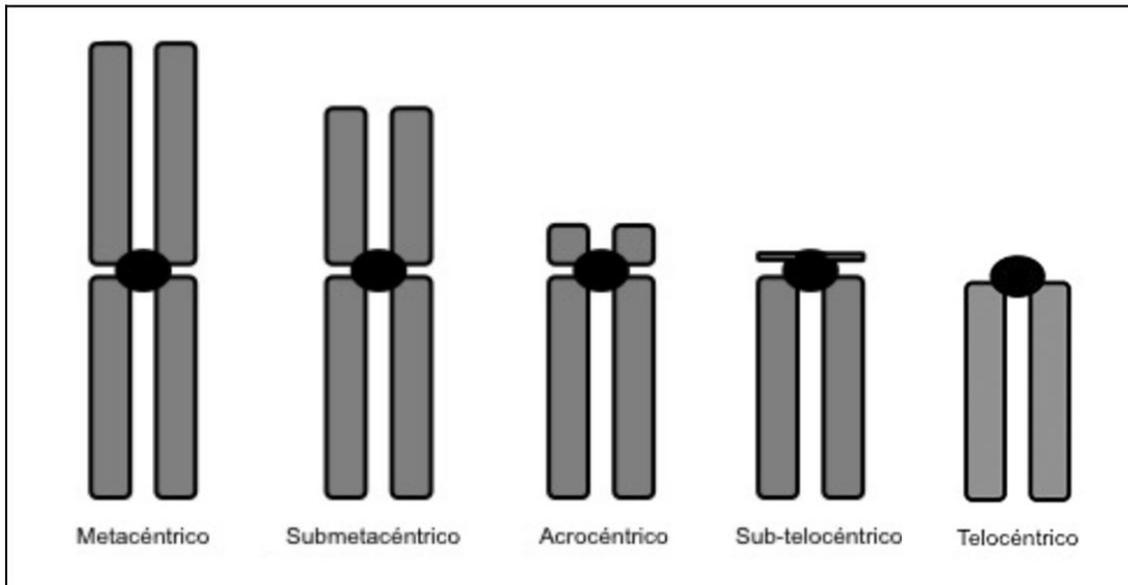


Figura 3.3. Representación esquemática de algunas formas de cromosomas de acuerdo a la posición del centrómero.

Los diferentes organismos tienen diferentes números de cromosomas. En la mayoría de las especies las células somáticas durante la mayor parte del ciclo vital presentan dos juegos idénticos de cromosomas, de manera que el número de cromosomas se representa por $2n$ y se denomina número diploide. A veces se hace referencia nada más al valor n o haploide. Así, en condiciones normales, las células diploides presentan cada cromosoma repetido, formando n pares de cromosomas homólogos. El rango de variación del número de cromosomas de especies es muy amplio, pudiendo hallarse especies como el nematodo *Parascaris univalens*, con $n=1$ o el lepidóptero *Lysandra atlantica*, $n=217-233$. Entre las plantas, los números cromosómicos más bajos corresponden a la asterácea *Haplopappus gracilis*, $n=2$ y entre los más altos se encuentra el helecho *Ophioglossum reticulatum* $n=720$. El ser humano posee 23 pares de cromosomas - 22 pares autosómicos y un par de cromosomas sexuales. Cada progenitor contribuye con un cromosoma de sus pares de autosomas y uno del par sexual, de manera que la descendencia obtenga la mitad de sus cromosomas de su madre y la mitad de su padre. Es importante resaltar que no hay una correlación directa entre el número cromosómico y el contenido de ADN, ni el número de cromosomas tiene un significado evolutivo directo.

Cariotipo

Es la caracterización del complemento cromosómico de una célula, tal como se observa durante la metafase mitótica. El estudio de las características morfológicas externas de los cromosomas incluyendo el número, forma y tamaño, ordenando los cromosomas homólogos según estándares internacionales en relación con su tamaño y forma (Figura 3.4).

El cariotipo es representativo de cada especie, construida en base a valores como son la longitud relativa y el índice centromérico (relación entre la longitud del brazo corto y la longitud total del cromosoma), entre otras mediciones.

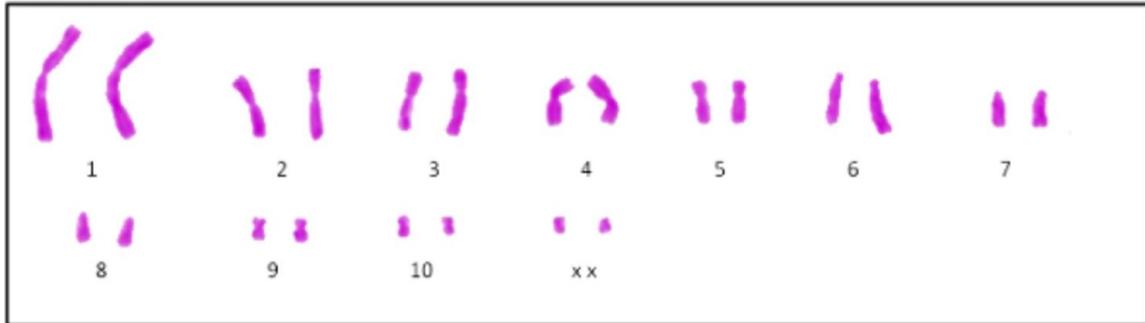


Figura 3.4: Cariotipo de hámster $2n=22$ (Foto original Nikoloff-Ruiz de Aracaute).

Idiograma

Es la representación esquemática del complemento haploide de una especie, ordenado por tamaño, forma y patrón de bandas. Los cromosomas se colocan alineados por el centrómero y con el brazo largo siempre hacia abajo (Figura 3.5).

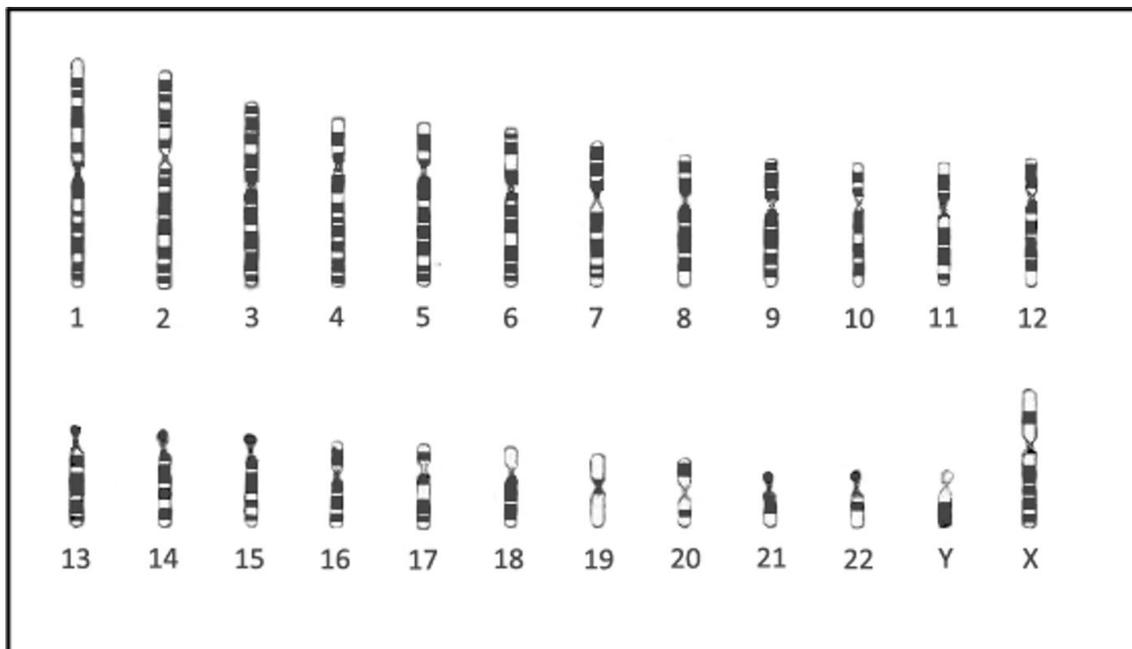


Figura 3.5. Idiograma de *Homo sapiens*.

Bandeo cromosómico

La aplicación de distintos tratamientos pone en evidencia características de la estructura, organización y composición de los cromosomas, originando una distribución que recibe el nombre de bandeo cromosómico. El bandeo está compuesto por bandas claras y oscuras alternadas, que aparecen por toda la longitud del cromosoma luego de ser coloreados con una tinción. Cada cromosoma presenta un patrón de bandeo único, por lo que es de gran utilidad para identificar los cromosomas en el cariotipo. Las regiones que se tiñen muy densamente están compuestas por heterocromatina con un alto grado de compactación, mientras que las regiones menos teñidas están compuestas de eucromatina, menos compacta, la cual contiene la mayoría de genes activos.

Tipos de bandeo:

- El bandeo G se ha convertido en el más utilizado y emplea el colorante Giemsa, el cual colorea regiones del ADN ricas en AT. Esta técnica muchas veces requiere un pretratamiento de los cromosomas con una enzima proteolítica como la tripsina.
- El bandeo R requiere el pretratamiento de las células con una solución salina caliente que desnatura el ADN rico en AT. Luego de este paso, los cromosomas son coloreados con Giemsa. El bandeo que muestra es el inverso a las bandas G.
- El bandeo C colorea áreas de heterocromatina, que están densamente empaquetadas y contienen ADN repetido. Los preparados se tratan con álcali moderadamente fuerte (NaOH, Ba(OH)₂) seguido por solución salina caliente y tinción con Giemsa. El tratamiento degrada el ADN cromosómico y lo extrae selectivamente de las partes eucromáticas del cromosoma, dejando que las zonas heterocromáticas se tiñan intensamente con Giemsa. El nombre de bandeo C se debe a que produce bandas constantes que corresponden a regiones de heterocromatina constitutiva que no se descondensa en interfase, siendo visibles durante todo el ciclo celular y manteniendo su tamaño constante.
- El bandeo Q, es producido por coloración con fluorocromos (quinacrina, acridina, DAPI, cromomicina, etc) y sus derivados, que colorean regiones ricas en AT. Para la observación, es necesario utilizar microscopio de fluorescencia.
- El bandeo NOR (nucleolar organizing región) es un método que revela las regiones organizadoras nucleolares, sitio del cromosoma donde se localizan los clusters de genes ribosomales (ADNr). Es una variante del bandeo C.

Cromosomas politénicos

En organismos donde se producen rondas sucesivas de replicación del ADN, sin que este se separe, se producen cromosomas gigantes o politénicos. La politenia es un caso ex-

tremo de endorreduplicación, donde en el ciclo de división celular se modifica la alternancia normal de las fases S y M, de manera que luego de una mitosis se producen periodos de síntesis sucesivos. Como consecuencia, los cromosomas politénicos se encuentran conformados por 2^n cromátidas. Debido a la yuxtaposición de las copias de las cromátidas presentes, se observan fácilmente los característicos patrones de bandas, los cuales sirven como marcadores.

La politenia es un mecanismo de amplificación génica dentro de un proceso citogenético de citodiferenciación, por lo cual estos cromosomas pueden formarse en células de tejidos de gran actividad metabólica. Pueden encontrarse en células especializadas de los túbulos de Malpighi, recto, intestino, almohadillas de las patas y glándulas salivales de insectos dípteros y lepidópteros, en trofoblastos de roedores, en protozoos ciliados y en tejidos como el saco embrionario y haustorios de algunas plantas. El ejemplo más estudiado son las glándulas salivales de *Drosophila melanogaster* (Figura 3.6). Su número cromosómico es $2n=8$, formado por el par 1 (sexual), par 2 y 3 autosómicos, grandes y submetacéntricos y el par 4, autosómico y subtlocéntrico. Aun así, en los órganos especiales que poseen cromosomas politénicos solo podemos observar cuatro cromosomas. Durante la formación de las glándulas salivales, las células se dividen hasta alcanzar un número aproximado de 125 células por glándula. A partir de este momento las células no se dividen más y aumentan de tamaño por el proceso de endorreduplicación, momento que coincide con la eclosión de la larva. Durante el proceso de replicación, los miembros de cada par de homólogos se unen de forma inesperada, quedando los 4 cromosomas unidos por una estructura llamada *cromocentro*, la cual es una fusión de los centrómeros de las cuatro cromátidas. Esto le da a los cromosomas politénicos un aspecto de “estrella de mar”. En *D. melanogaster*, hay cinco brazos claramente visibles y un sexto corto, difícil de diferenciar del cromocentro. Cada brazo de la “estrella de mar”, corresponde a un par de brazos cromosómicos homólogos íntimamente apareados, siendo así los brazos 2R y 2L, 3R y 3L y el par sexual XX o XY. El sexto brazo, muy corto, corresponde al apareamiento del par de homólogos puntiformes (Figura 3.6). En estos cromosomas, se emplean las letras R y L para referirse al brazo derecho (*right*) e izquierdo (*left*), y se asignan de forma arbitraria. Es importante destacar que en otros géneros de dípteros los cromosomas politénicos se encuentran sueltos, sin cromocentro.

Si bien el patrón de bandas es esencialmente constante, a lo largo del desarrollo determinadas bandas pueden cambiar su morfología, observándose zonas más o menos difuminadas y abultadas denominadas *puffs*. Estos se forman por desenrollamiento de la cromatina correspondiente a los cromómeros, siendo que en la mayoría de los casos cada *puff* se origina a partir de una sola banda y su interbanda adyacente. Su tamaño es variable y representan la expresión de los genes, ya que se ha demostrado la relación entre la presencia o ausencia de *puffs* y la actividad o inactividad génica. Los mismos han sido observados con mayor frecuencia en fases particulares del desarrollo, como en momentos previos a las mudas,

en ciertos tejidos, asociados a la expresión de genes específicos y también hasta inducidos por tratamientos experimentales.

Los cromosomas politénicos, al tener un tamaño mayor que el de los cromosomas normales, pueden ser observables al microscopio óptico en interfase, lo que los convierte en un material idóneo para estudiar citológicamente la expresión génica. Asimismo, el patrón de bandas que poseen es constante, lo cual permitió construir mapas citológicos y ofrecen oportunidades para estudiar el control de la síntesis de ADN debido a la independencia de las unidades de replicación, lo que se manifiesta en una falta de uniformidad en el nivel de politenización de determinadas regiones cromosómicas.

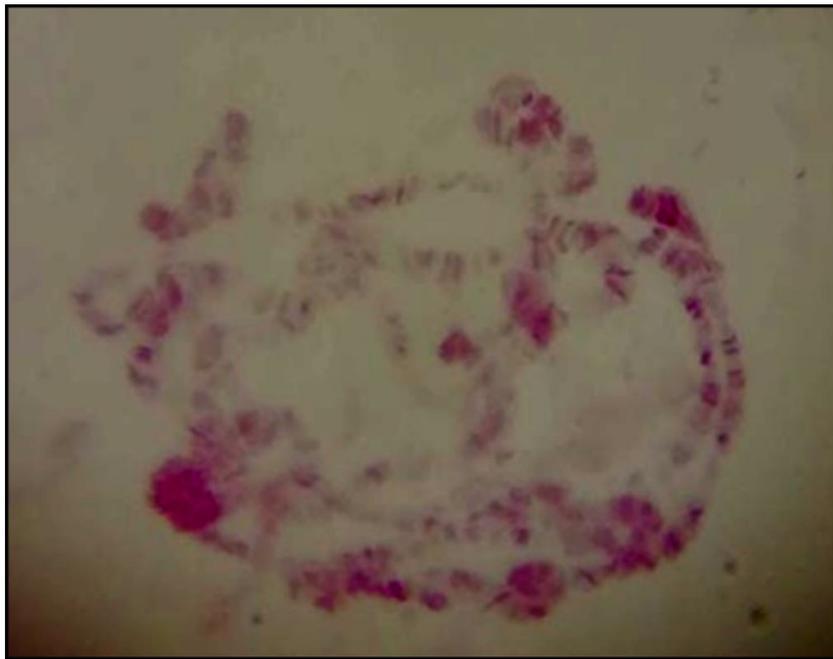


Figura 3.6. Cromosomas politénicos (Foto original Cátedra de Genética-FCNyM).

Cromosomas plumosos

Los cromosomas plumosos también llamados plumulados o en escobilla son un tipo especial de cromosomas característicos de la fase diplotene de la meiosis en oocitos de muchas especies animales. Son cromosomas descondensados que muestran por parejas lazos característicos que son activos en la síntesis de ARN como consecuencia de la transcripción génica. Estos tipos de cromosomas han sido ampliamente estudiados en oocitos de anfibios, aunque también se pueden encontrar en espermatozoides de insectos y mamíferos, así como en células meióticas de algas, hongos y plantas.

Se denominan “plumosos” por su semejanza a los cepillos cilíndricos o “limpiatubos” (Figura 3.7). Poseen una gran longitud (25 a 80 veces mayores a los cromosomas mitóticos), siendo los más grandes los de oocitos de tritones (*Triturus* sp.) y salamandras (*Salamandra* sp.), de 1

mm de longitud. Debido a su estructura frágil no pueden ser estudiados empleando las técnicas convencionales de aplastamiento (squash) o corte. Los cromosomas plumosos aparecen asociados por parejas por medio de los quiasmas.

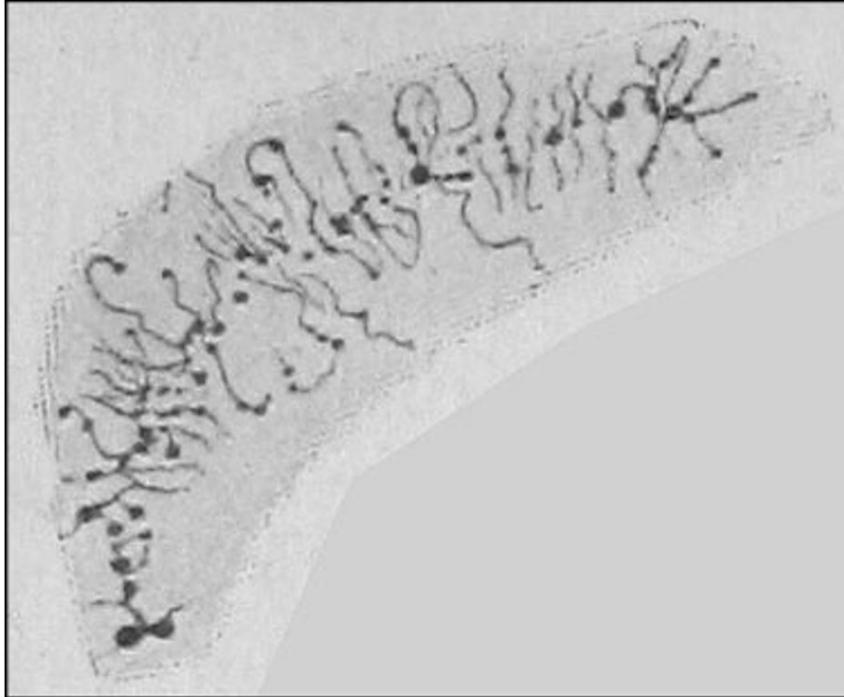


Figura 3.7. Cromosoma plumoso de Tritón.

Alteraciones del material genético

Las alteraciones del material genético pueden ocurrir en dos niveles: *génico* por sustitución, deleción o inserción de bases o cromosómico. Pueden ser inducidas por distintos agentes químicos, físicos o biológicos. Las alteraciones cromosómicas pueden afectar tanto el número como la estructura del complemento cromosómico de un individuo (Figura 3.8). En general, las alteraciones cromosómicas se originan por errores durante el proceso de división celular en el caso de alteraciones numéricas o errores durante la interfase del ciclo celular cuando hablamos de alteraciones estructurales. Dichas alteraciones pueden ocurrir tanto en células somáticas como germinales, si ocurren en estas últimas pueden llegar a ser transmitidas a la descendencia, generando anomalías congénitas y consecuencias negativas a la salud.

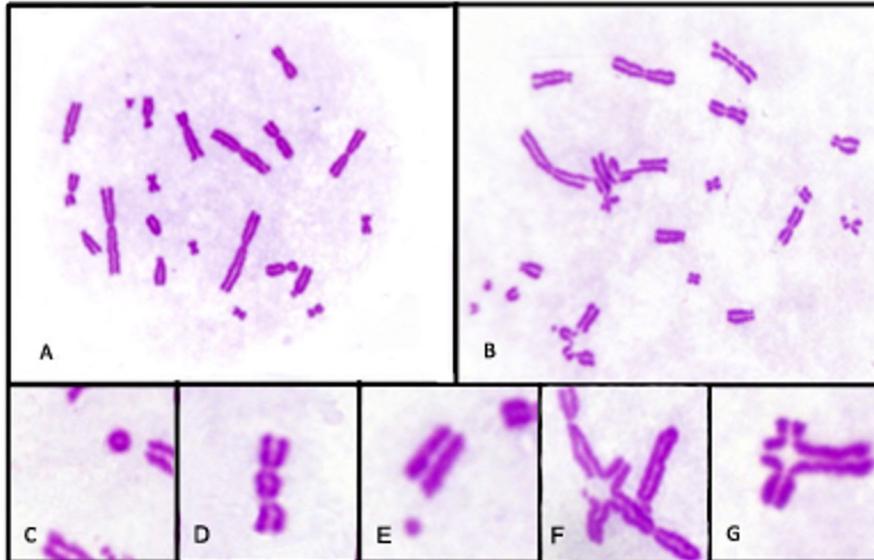


Figura 3.8. A. Metafase de cultivo de células de ovario de hámster chino (CHO-K1). A. Normal; B. Aberrante; C. Anillo; D. Cromosoma dicéntrico; E. Fragmento acéntrico; F. Intercambio; G. Intercambio de cromátida cuadrirradial (Fuente: Cátedra de Citología. FCNyM.UNLP).

Cambios cromosómicos numéricos

Implican la ganancia o pérdida de uno o varios cromosomas completos, y afectan al número cromosómico normal de una especie. Se define como Heteroploidía a cualquier alteración en el número cromosómico normal de una especie dada. Dentro de ella se consideran las siguientes alteraciones:

a) Euploidía:

Cambio en el número de dotaciones completas de los cromosomas. Algunas de las causas que pueden dar origen a este tipo de anomalías son alteraciones durante la mitosis, como una falla en la membrana nuclear que no se desintegra (endomitosis), en el huso mitótico que es defectuoso o no existe (C-mitosis), falla en la fase S del ciclo donde cada cromosoma se duplica más de una vez entre dos mitosis (endorreduplicación) luego de varios ciclos el cromosoma se encuentra formado por 8 o 16 cromátidas, falla en la separación de los polos del huso generando núcleos con forma de pesa de gimnasio (restitución), falla en el centrosoma dividiéndose más de una vez y formando husos multipolares (mitosis multipolares) o puede ocurrir una constricción directa del núcleo sin que haya condensación y segregación cromosómica dando como resultados dos células hijas desiguales (amitosis). Podemos clasificar a las euploidías en:

- I. Monoploidías o Haploidías: los organismos presentan un solo juego de cromosomas. Algunos ejemplos de organismos haploides (n) están conformados por algas y hongos en la mayor parte de su vida. Otro ejemplo son los gametos, óvulos y espermatozoides.

- II. Poliploidías: los organismos, por duplicación del complemento somático entero, presentan más de una dotación cromosómica. Por ejemplo organismos triploides ($3n$), tetraploides ($4n$), pentaploides ($5n$). Es muy común en plantas.

b) Aneuploidía:

El número de cromosomas difiere por pérdida o ganancia de uno o más cromosomas con respecto a la dotación normal de un individuo. Puede suceder tanto en autosomas como en cromosomas sexuales y pueden originarse por falla de los cromosomas homólogos o cromátidas hermanas de migrar a los polos opuestos durante la división celular, por no disyunción en mitosis, meiosis I o II (Figura 3.9) o por la presencia de cromosomas rezagados en la anafase (*anafase lag*) que quedan excluidos del núcleo.

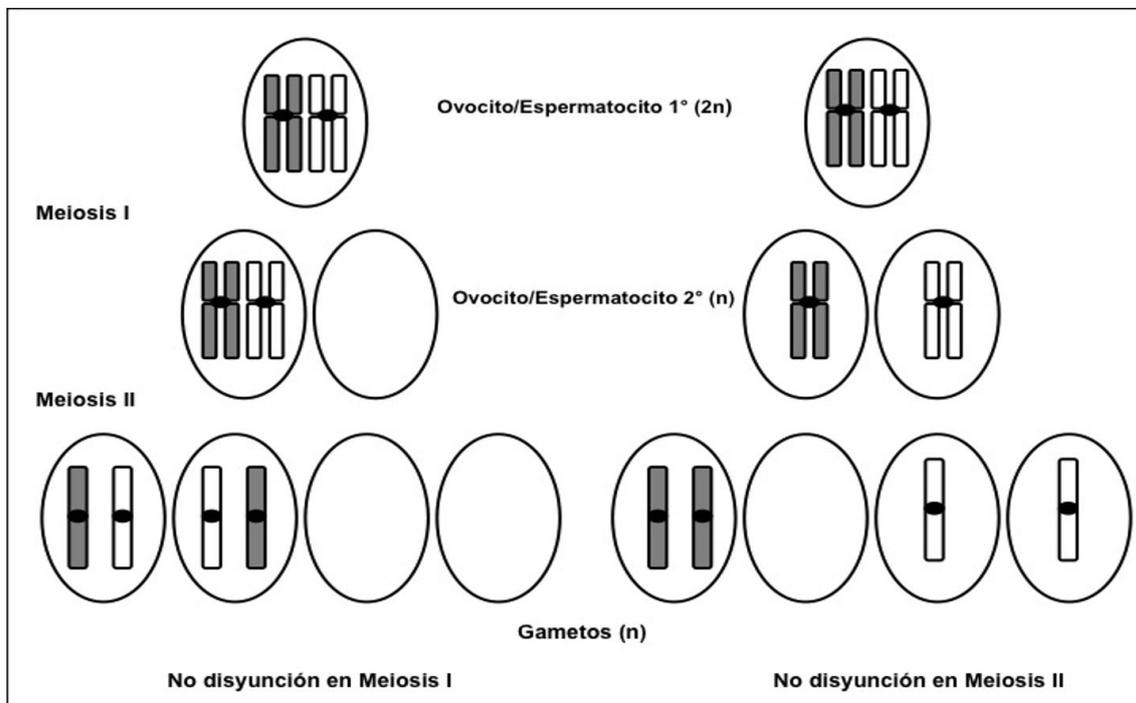


Figura 3.9. Representación esquemática de un evento de no disyunción en meiosis I y meiosis II. En una meiosis normal, se espera que todos los gametos formados sean n . Una no disyunción en meiosis I origina dos gametos disómicos y dos nulisómicos (100% gametos anormales). Una no disyunción en meiosis II origina dos gametos normales, n , un gameto disómico y uno nulisómico (50% gametos normales, 50% gametos anormales).

Podemos clasificar a las aneuploidías en Hipodiploide o Hiperdiploide.

Dentro de Hipodiploide podemos mencionar algunos ejemplos:

- I. **Monosomía:** organismos a los que les falta un cromosoma completo. Su dotación es $2n-1$ cromosomas. Se produce este caso cuando un gameto irregular ($n-1$) se une con un gameto normal y forma un cigoto $2n-1$, por ejemplo en el humano Síndrome de Turner, pérdida de un cromosoma X ($45, X$).
- II. **Nulisomía:** organismos que carecen de un par de cromosomas homólogos. Su dotación cromosómica es $2n-2$.

Dentro de Hiperdiploide encontramos a las Polisomías, cuando un organismo tiene más de dos cromosomas por juego, podemos mencionar algunos ejemplos:

- I. Trisomía: se originan cuando un cromosoma se duplica tres veces. Su dotación cromosómica es $2n+1$. En la doble trisomía, este evento sucede dos veces en dos cromosomas distintos (dotación $2n+1+1$). Por ejemplo: Síndrome de Down trisomía del cromosoma 21 ($47, XX, + 21$; $47, XY, + 21$); Síndrome de Klinefelter los individuos tienen un cromosoma X extra ($47, XXY$).
- II. Tetrasomía: se originan cuando un cromosoma se duplica cuatro veces, teniendo cuatro copias del mismo cromosoma. En ocasiones las copias no son del cromosoma completo pero si de una fracción del mismo. Su dotación cromosómica es $2n+2$. Ejemplo: Síndrome del ojo de gato, es una alteración en la que hay 4 copias de un fragmento del cromosoma 22 humano.

c) Mixoploidía o mosaico:

Tejido o célula que presenta un número de cromosomas distinto al que tienen los restantes tejidos o células de su entorno. Puede ocurrir por eventos de no disyunción o *anafase lag* durante la embriogénesis. La mixoploidia es muy común en plantas.

En ciertos organismos existen cambios en el número cromosómico que son generados por otros mecanismos como es la hibridación. Un **híbrido** es un organismo animal o vegetal que procede del cruce mediante la reproducción sexual de dos organismos de distintas especies o subespecies. La hibridación es rara en animales pero se pueden presentar casos, por ejemplo, en grupos de peces y anfibios. Sin embargo, en plantas tiene una función importante en la evolución. La poliploidía en helechos y angiospermas es considerada un fenómeno asociado a la hibridación y por lo tanto se interpreta como una evidencia de que esta última ha desempeñado un papel crucial en la historia filogenética de muchas plantas.

Cambios cromosómicos estructurales

Podemos clasificar a las alteraciones estructurales en intracromosómicas e intercromosómicas. Las primeras ocurren cuando los cortes ocurrieron en el mismo cromosoma como deleciones, duplicaciones, anillo e inversiones. Las alteraciones intercromosómicas ocurren cuando hay intercambio de material entre dos cromosomas como en el caso de las translocaciones, translocaciones robertsonianas y cromosomas dicéntricos (Figura 3.10).

- a) **Delección:** Se pierde un segmento cromosómico que puede ser intersticial o terminal, por ejemplo en humanos el Síndrome de Angelman ocurre por delección de una región del cromosoma 15.
- b) **Duplicación:** Cuando una parte del cromosoma se duplica y el mismo queda con un segmento extra. Las duplicaciones pueden tener importancia a nivel evolutivo.

- c) **Anillo:** Ocurre cuando existen dos sitios de ruptura en los extremos de un mismo cromosoma y los brazos se unen dando origen a un cromosoma circular. Las repercusiones en el fenotipo son variables.
- d) **Inversión:** Se produce cuando el orden lineal de un segmento cromosómico se invierte 180° tras haberse producido dos fracturas en un cromosoma. Cuando el segmento invertido incluye al centrómero constituye una inversión pericéntrica, y cuando no lo incluye constituye una inversión paracéntrica. Las inversiones pueden tener importancia a nivel evolutivo, por ejemplo, inversiones en una región del cromosoma 3 de la mosca *Drosophila pseudoobscura* a lo largo de varias generaciones resultaron adaptativamente beneficiosas para la supervivencia en un determinado hábitat. Por el contrario, se puede perder la función de un gen si la inversión ocurre en una región que lo divide en dos partes.
- e) **Translocación:** Se trata de un reordenamiento por intercambio de segmentos de cromosomas dentro del complemento cromosómico. Este reordenamiento puede darse dentro de un mismo cromosoma (translocaciones internas) o que un segmento pase a otro cromosoma, dando intercambios. Estos últimos pueden ser recíprocos, cuando se da un intercambio de material genético entre dos cromosomas distintos (translocación recíproca) o no recíprocos, cuando el traspaso ocurre sólo en una dirección (translocación no recíproca o inserción). Un tipo común de translocación son las **translocaciones robertsonianas**: Se da el intercambio de brazos enteros de cromosomas. Pueden ocurrir por fusión centromérica (unión de dos cromosomas acrocéntricos), lo que reduce el número de cromosomas totales o por fisión centromérica (un cromosoma submetacéntrico o metacéntrico se separa en dos), en cuyo caso el número de cromosomas se ve aumentado. Ejemplo de esta alteración es la translocación robertsoniana 1/29 que se da en el bovino, donde el cromosoma 1 se fusiona con el 29 y así se reduce el número cromosómico de la especie.
- f) **Dicéntricos:** es un cromosoma que posee dos centrómeros. Es un reordenamiento desbalanceado y son muy inestables a menos que uno de los dos centrómeros esté inactivo, o ambos estén tan cerca que puedan actuar como uno solo.
- g) **Dobles diminutos:** aparecen como fragmentos muy pequeños y generalmente en parejas. Pueden indicar deleciones intersticiales, o estar asociados a procesos de amplificación (onco)génica.
- h) **Isocromosoma:** Falla en la separación longitudinal de las cromátidas que se separan transversalmente. Los brazos del isocromosoma resultante son genéticamente idénticos entre sí. En el caso de un cromosoma submetacéntrico, las cromátidas resultantes son asimétricas, una formada por dos brazos largos y otra por dos brazos cortos.

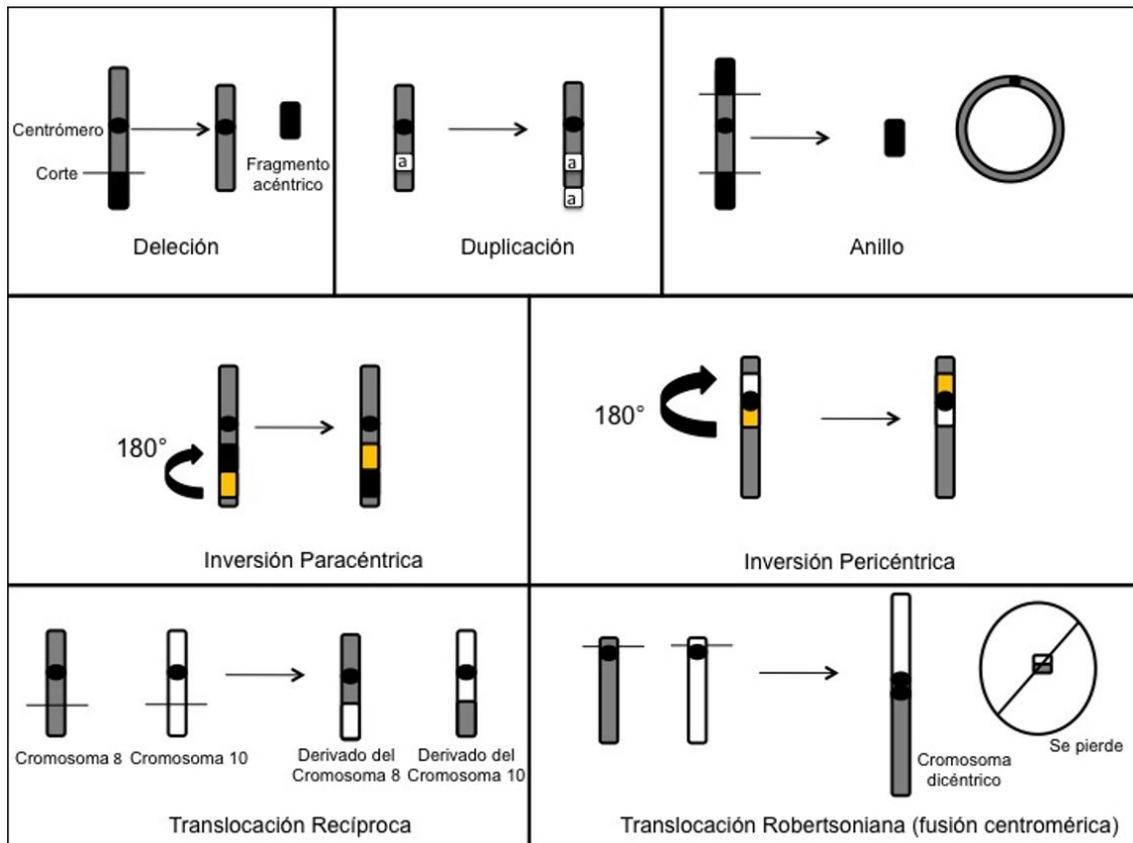


Figura 3.10. Alteraciones cromosómicas estructurales.

Cuando la reorganización no produce pérdida ni ganancia de material cromosómico se dice que la anomalía es equilibrada. En general, no hay efecto en el fenotipo pero existe riesgo de generar gametos desequilibrados como es el caso de inversiones y translocaciones recíprocas. Por otro lado, cuando la reorganización es desequilibrada provoca pérdida o ganancia de material cromosómico y normalmente hay efectos fenotípicos severos. Es el caso de deleciones y duplicaciones.

Durante la meiosis, los cromosomas homólogos tienen que alinearse para poder llevar a cabo el alineamiento, crossing over y segregación. Si uno o ambos poseen alguna alteración estructural, pueden modificar este apareamiento de diversas maneras dependiendo de la anomalía presente en ellos. Por ejemplo:

- Un cromosoma con una inversión paracéntrica adopta una estructura en bucle para poder alinear sus regiones con su homólogo. Si ocurre un evento de recombinación en el bucle el resultado va a ser que uno de los cromosomas va a ser dicéntrico y el otro un fragmento acéntrico. Por lo tanto, las gametas van a llevar alteraciones estructurales desequilibradas.
- Un cromosoma con una inversión pericéntrica forma también el bucle, pero una recombinación en el asa dará lugar a dos cromosomas normales (con un centrómero) pero con alteraciones de duplicaciones y deleciones y las gametas también serán desequilibradas.

- c) Cromosomas con translocación recíproca equilibrada (no hay pérdida, ni ganancia de material genético, individuo normal) para que puedan segregarse correctamente en la meiosis han de alinearse en una estructura llamada cuadrivalente (involucra cuatro cromosomas). En este caso la segregación puede ser de dos maneras: adyacente, donde el 100% de las gametas van a estar desequilibradas, o alternante, donde el 50% de las gametas serán normales y el 50% equilibradas (Figura 3.11).

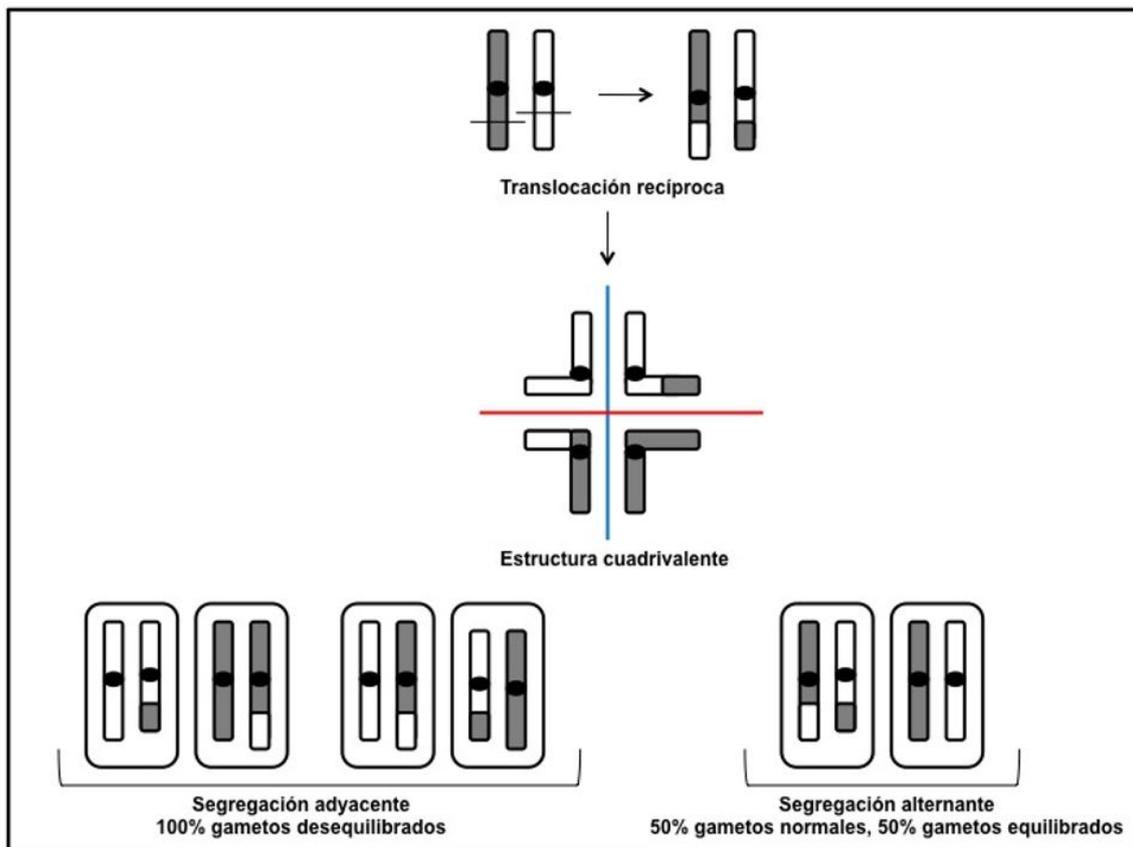


Figura 3.11. Representación esquemática de la estructura cuadrivalente formada en la meiosis debido a una translocación recíproca.

Mecanismos de determinación sexual

En la naturaleza se encuentran al menos dos mecanismos de determinación sexual:

1. La *determinación genética del sexo*, mediante el cual uno o varios genes determinan que el embrión se desarrolle como macho o hembra. Pueden encontrarse:
 - a. Heterogamia: es la más común de los sistemas de determinación cromosómica, existen cromosomas heteromorfos, es decir, cromosomas sexuales diferentes, en forma y tamaño, en machos y hembras. La heterogamia puede ser

masculina (XY), como en el caso de mamíferos, nematodos, moluscos, equinodermos y la mayor parte de los artrópodos o femenina (ZW), como en las aves, lepidópteros, reptiles y algunos anfibios. También se observa heterogamia masculina en el sistema determinado por la proporción de cromosomas X respecto de la proporción de cromosomas autosómicos, como en dípteros (*Drosophila sp.*). En esta especie, el cromosoma Y es indispensable para que los machos tengan espermatogénesis. En la mayoría de los anfibios, reptiles y peces los cromosomas sexuales no son detectables citológicamente. En anuros se dan los dos tipos de determinación XX-XY y ZW-ZZ. Ocasionalmente pueden encontrarse los dos tipos de determinación cromosómica en una misma especie, como en *Glandirana rugosa*. En el hombre el cromosoma Y es más pequeño que el X. En función de la localización de los genes en estos cromosomas, se conoce la herencia ligada al sexo (ligada al cromosoma X) y la herencia holándrica (herencia ligada al cromosoma Y).

En plantas también se da la existencia de cromosomas sexuales, como es el caso de la hepática *Sphaerocarpus donnelii*, donde en los gametos femeninos hay un cromosoma X grande y en el masculino un Y pequeño, en briofitas y algas como *Saccorhiza polyschides*. En angiospermas, se han observado cromosomas sexuales en *Cannabis sativa*, *Melandrium album*, entre otras.

- b. Haplodiploidía (arrenotoquia): Este método de determinación sexual no depende de cromosomas sexuales, aunque machos y hembras poseen diferente constitución cromosómica. Los machos son haploides (se originan a partir de huevos no fertilizados, partenogénicamente por arrenotoquia) y las hembras diploides (se originan a partir de huevos fertilizados). La determinación puede ser ambiental, basada en la fertilización; o puede ser genotípica si está basada en el nivel de ploidía u otro. Se da dentro de algunos órdenes de insectos, como himenópteros, homópteros, tisanópteros y coleópteros.
 - c. Determinación polifactorial (poligenética): la determinación del sexo está dada por la interacción de muchos factores. Este sistema se observa en peces.
2. La *determinación ambiental del sexo*, en la cual mediante algún factor ambiental (generalmente la temperatura) se determina el sexo del embrión. Se da principalmente en algunos reptiles, como todos los cocodrilos, la mayoría de las tortugas y algunos lagartos, la temperatura de incubación de los huevos durante un periodo crítico en el desarrollo embrionario es clave para determinar el sexo. Asimismo, participan también el nivel nutricional de la madre y el fotoperiodo.

Ejercicios

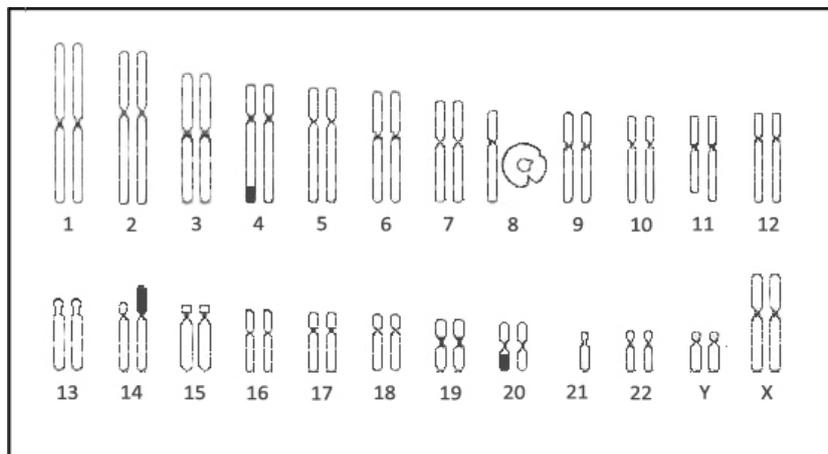
1. El número cromosómico de *Raphanus sativus* (rábano) es $2n=18$. indique la alteración cromosómica presente si el número de cromosomas en una célula es:

- | | |
|-------|-------|
| a) 36 | d) 20 |
| b) 17 | e) 16 |
| c) 9 | f) 27 |

Resolución: a) Tetraploidía $4n=36$; b) Monosomía $2n-1=17$; c) Monoploidía $n=9$; d) Trisomía $2n+2=20$ o doble Trisomía $2n+1+1=20$; e) Nulisomía $2n-2=16$ o doble Monosomía $2n-1-1=16$; f) Triploidía $3n=27$

2. Grafique el cariotipo de un hombre con las siguientes anomalías:

- Deleción en el brazo largo del cromosoma 11
- Translocación recíproca balanceada entre los cromosomas 4 y 20
- Cromosoma 8 en anillo
- Translocación robertsoniana entre cromosomas 14 y 21



3. ¿Cuántas cromátidas hay en las siguientes células o estadios celulares si $2n=28$?

- a) Fin de la meiosis I
- b) Metafase meiosis I
- c) Telofase meiosis II
- d) Metafase de la mitosis
- e) Telofase de la mitosis

Resolución: a) 28; b) 56; c) 14; d) 56; e) 28

Referencias

- Aiassa, D., Bosch, B., Gentile, N., Mañas, F. & Gorla, N. (2015). *Manual Citogenética: Teoría y Práctica*. 1ra Edición. Editorial Cepyd, Córdoba.
- Bureš, P., Zedek, F., & Marková, M. (2013). Holocentric chromosomes. In *Plant genome diversity volume 2*. Springer, Vienna, pp. 187-208
- Cooper, G., Hausman, R. (2007). *La célula*. 3ra edición. Marban.
- Ferguson-Smith, M. A. (2015). History and evolution of cytogenetics. *Molecular cytogenetics*, 8(1), 19.
- Flores Franco, G., Vega Flores, K., Aguirre López, R., Valencia Ávalos, S. (2016). Hibridación y poliploidía en plantas. *Ciencias*, núm. 120-121, pp.76-85.
- Gersen, S. L. (2013). History of clinical cytogenetics. In *The Principles of Clinical Cytogenetics*. Springer, New York, pp. 3-8.
- Griffiths, A. J. F., Gelbart, W. M., Miller, J. H. & Lewontin, R. C. (2004). *Genética Moderna*. McGraw-Hill. Interamericana, España.
- Griffiths, A. J. F., Miller, J. H., Suzuki, D., Lewontin, R. C. & Gelbart, W. (1995). *Introducción al análisis genético*. 5ta edición. McGraw-Hill Interamericana, España.
- Lacadena, J. R. (1996). *Citogenética*. Editorial Complutense, Madrid.
- Paweletz, N. (2001). Walter Flemming, Pioneer of Mitosis Research. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2, 72-75.

CAPÍTULO 4

Citogenética Aplicada

*Graciela González, Alejandro D. Bolzán
y Eliana R. Steinberg*

La Citogenética como disciplina que estudia el comportamiento y la estructura de los cromosomas y su relación con la transmisión y recombinación de los genes, proporciona diferentes niveles de análisis, constituyendo una herramienta fundamental para estudios taxonómicos, evolutivos y de genómica estructural y funcional. En el presente capítulo, se ejemplifican tres aplicaciones de la citogenética en el ámbito vegetal y animal: la citogenética en el estudio evolutivo y aplicado del maíz y sus especies relacionadas, la aplicabilidad de la técnica de Hibridación *In Situ* Fluorescente (FISH) para la identificación de telómeros y secuencias teloméricas intersticiales (STI) y el estudio de las aberraciones cromosómicas que los involucran y la caracterización citogenética en el manejo de primates en cautiverio.

La citogenética en el estudio evolutivo y aplicado del maíz y sus especies relacionadas

Análisis del cariotipo

Los estudios citogenéticos clásicos en plantas permiten analizar las características del cariotipo (número, tamaño y simetría de los cromosomas, posición de los centrómeros, cantidad y distribución de la heterocromatina). Además, evalúan el tamaño del genoma y analizan el comportamiento meiótico de los cromosomas en razas, especies, híbridos y poliploides. Las características del cariotipo son generalmente constantes en un grupo de especies y aún de géneros, pero a menudo ocurren variaciones estructurales y/o numéricas entre especies relacionadas, incluso dentro de una misma especie. Estas variaciones han sido encontradas, entre otros, en el género *Zea* que incluye al maíz y sus especies silvestres relacionadas (teosintes), donde empleando tinciones convencionales se describieron los cariotipos de cada especie (Figura 4.1) y se detectaron cromosomas B en número variable. Los cromosomas B son accesorios al complemento cromosómico normal de la especie (complemento A), son heterocromáticos, no codificantes, sin funciones vitales para el organismo y con mecanismos de impulso meiótico que hacen que se hereden con mayor

frecuencia que la esperada por herencia mendeliana. Estos abren un nuevo campo de investigación en lo que se refiere a su manejo como portadores de genes útiles en programas de mejoramiento genético. En razas de maíz nativas del noroeste argentino y en razas de Bolivia, cultivadas a lo largo de un gradiente altitudinal, se observaron individuos portando de 0 a 8 cromosomas B (Fig. 4.1). La correlación positiva detectada entre número y frecuencia de cromosomas B y la altitud de cultivo permitió sugerir un significado adaptativo para estos cromosomas accesorios.

Contenido de ADN. Variación del tamaño del genoma

El contenido de ADN de una especie en general se expresa en picogramos (pg, 10^{-12} g) y actualmente se mide por citometría de flujo. Esta técnica se basa en hacer pasar una suspensión de núcleos teñidos con un fluorocromo (DAPI o Ioduro de Propidio) por delante de un rayo de luz láser. Se miden las intensidades de fluorescencia a diferentes longitudes de onda emitida por cada núcleo, siendo la cantidad de señales de fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN. Estas señales de intensidad de fluorescencia son recogidas por detectores que las convierten en señales electrónicas que posteriormente son digitalizadas para permitir la medida del contenido de ADN del núcleo. Esta técnica presenta la ventaja de analizar un elevado número de núcleos en un corto período de tiempo.

El tamaño del genoma es muy variable entre grupos de plantas, de hecho en angiospermas oscila entre 0,05 pg en *Cardamine* y 127 pg en *Fritillaria*, y es independiente de la complejidad orgánica. El contenido de ADN puede variar por aumento o disminución del nivel de ploidía, aneuploidía, polimorfismo numérico para cromosomas B, reestructuraciones cromosómicas con pérdida o duplicación de material genético y pérdida o ganancia de secuencias repetitivas no codificantes, las que pueden estar conformando bloques o dispersas en el genoma.

En *Zea* existe variación intra e interespecífica en el contenido de ADN. En líneas y razas argentinas de maíz (*Zea mays* ssp. *mays*) oscila entre 4,9 pg y 6,9 pg, mientras que *Zea luxurians* posee 9,2 pg, el mayor contenido de ADN del género. Esta amplia variación se debe principalmente a las diferencias de bloques heterocromáticos, denominados *knobs*, formados por secuencias altamente repetidas en *tándem*, o sea una detrás de la otra. Otros componentes responsables de la variación del tamaño del genoma en *Zea* son la presencia en número variable de cromosomas B y la abundancia diferencial de secuencias repetitivas dispersas como los elementos transponibles.

En el análisis cariotípico de las distintas razas de maíz nativas del noroeste argentino (NOA) se observó una correlación negativa significativa entre el contenido de heterocromatina del complemento cromosómico A y la altitud de cultivo. Además, la disminución del contenido de ADN del complemento A se correlacionó con el aumento en la frecuencia poblacional de cromosomas B. Aunque se desconocen las causas de este *cline* divergente entre dos tipos de ADN no codificante, su observación repetida en distintos ambientes sugiere la exis-

tencia de fuerzas selectivas involucradas en el mantenimiento del *cline*. Por otra parte, el número y tamaño de los *knobs* se correlacionó negativamente con la altitud de cultivo. Si bien aún no se conocen las causas o mecanismos evolutivos que permitan explicar esta correlación, varios autores proponen que los *knobs* están sujetos a la acción de la selección tanto natural como artificial y, por lo tanto, adquieren valores adaptativos variables y se convierten en elementos muy importantes en la evolución de las poblaciones de *Zea*. Por lo tanto, la variabilidad en el tamaño del genoma observada en las distintas razas de maíz nativo poseería significado adaptativo en la evolución, diversificación y adaptación de las plantas a los distintos ambientes de cultivo.

Bandeo cromosómico con fluorocromos

Las técnicas de bandeo cromosómico, empleando los fluorocromos DAPI y CMA, revelan la cantidad y localización cromosómica de la heterocromatina y sus características citológicas. La molécula de DAPI (4'6'diamidino-2-phenylindole.2HCl) se intercala en el canal menor de la doble hebra de ADN compuesta por adenina-timina (AT), por lo tanto permite identificar las regiones cromosómicas de ADN altamente repetido rico en A-T que se observan como bandas de color azul brillante (bandas DAPI+). El CMA (Cromomicina A3) es un antibiótico fluorescente, no intercalante, que se une selectivamente a la doble hélice de ADN en las regiones ricas en guanina-citocina (G-C), por lo tanto revela a estas regiones cromosómicas como bandas brillantes de color amarillo-anaranjado (bandas CMA+). Ambos bandeos pueden emplearse de manera simultánea ya que brindan información complementaria. El mapeo de distintas bandas heterocromáticas sobre los cromosomas permite, en muchos casos, la identificación de cromosomas particulares. Un ejemplo notable de polimorfismo y politipismo para bandas heterocromáticas lo constituyen los taxones del género *Zea* (Figuras 4.1, 4.2A y 4.3B). Estos presentan variación en el tamaño, número y composición de *knobs*, los cuales se pueden encontrar en 34 posiciones diferentes en los cariotipos. El bandeo DAPI, que revela a los *knobs* como bandas DAPI+, permitió la discriminación cromosómica entre los taxones del género. Se observó que los *knobs* son subterminales en maíz, en *Zea mays* ssp. *mexicana* y en *Z. m.* ssp. *parviglumis*, terminales en *Z. luxurians* y en *Z. diploperennis*, y que no se encuentran en *Z. perennis*. Por otra parte, el bandeo CMA reveló que el número y la posición cromosómica de las regiones organizadoras del nucleolo (regiones ricas en AT, bandas CMA+) son conservados en *Zea*, carácter que por lo tanto carece de utilidad para la discriminación citogenética de las especies.

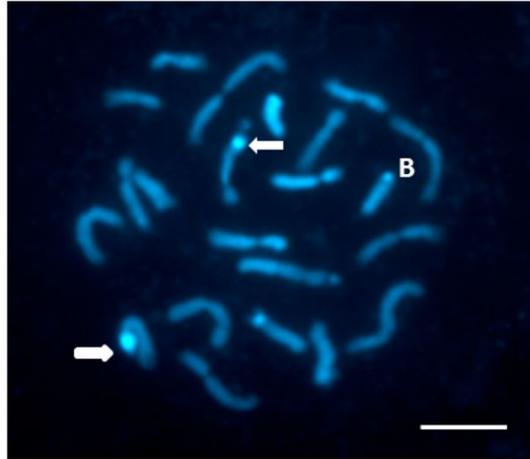


Figura 4.1. Bando DAPI sobre metafase mitótica de maíz de la raza Garrapata (raza nativa del noroeste argentino). Ref.: B: cromosoma B. Flechas blancas: bandas DAPI+ que denotan knobs. Barra: 10 μm . Fuente: Graciela E. González.

Análisis del comportamiento meiótico

El estudio del comportamiento meiótico durante la microsporogénesis permite dilucidar el origen y modos de especiación en plantas, así como también evaluar la afinidad relativa entre genomas en poliploides e híbridos inter o intraespecíficos. Además de la utilidad en estudios taxonómicos y evolutivos, conocer el modo de apareamiento de los cromosomas durante la meiosis es fundamental en el mejoramiento genético, ya que en la producción de híbridos de interés agronómico se debe lograr un máximo de fertilidad, lo cual está directamente relacionado con el comportamiento de los cromosomas durante la formación de sus gametos.

La poliploidía es uno de los fenómenos más comunes en la evolución de las plantas, de hecho se estimó que el 70% de las angiospermas y la mayoría de las especies de plantas útiles económicamente son poliploides. El análisis del comportamiento meiótico en especies e híbridos artificiales de *Zea* reveló la naturaleza alotetraploide del maíz ($2n=20$) y de los teosintes, y que $X=5$ es el número básico del género. La presencia frecuente de dos grupos asincrónicos de 5 bivalentes cada uno, asociados a husos acromáticos distintos, y la eventual persistencia de dos nucléolos evidenciaron los dos genomas ancestrales de 10 cromosomas cada uno, revelando así la naturaleza poliploide del género *Zea*.

Citogenética molecular

La citogenética molecular combina las herramientas de la citogenética clásica con la información molecular de las secuencias y se aplica a estudios citotaxonómicos, filogenéticos, evolutivos, biotecnológicos y de mejoramiento genético. Para realizar las técnicas de hibridación *in situ* se pueden emplear gran variedad de sondas, que son secuencias de ADN marcadas con fluorocromos que se hibridan según su homología sobre núcleos interfásicos o sobre cromosomas.

somas mitóticos o meióticos. Según el tipo de sonda podemos distinguir al GISH (Hibridación *In Situ* Genómica) que emplea ADN genómico total para revelar homologías genómicas entre taxones, y al FISH (Hibridación *In Situ* Fluorescente) que mediante la localización cromosómica de secuencias específicas (secuencias repetitivas, genes, ADNr, transgenes, retrovirus) permite obtener mapeos físicos, funcionales y estructurales de los genomas.

Con el objetivo de caracterizar e identificar citogenéticamente a las razas de maíz nativas del norte de la Argentina se realizó una amplia serie de experimentos de FISH. Se hibridaron simultáneamente las secuencias repetitivas descriptas para los *knobs* (180-pb y TR-1) sobre las metafases mitóticas de los distintos maíces cultivados en el NOA y en el NEA. Se observó que las señales de hibridación colocalizan con las bandas DAPI+, es decir con los *knobs*, y que ambas secuencias se pueden encontrar combinadas o aisladas, revelando así la constitución de secuencia de cada *knob* (Figuras 4.2A y 4.2B). Dentro de cada raza se observaron patrones constantes de número, tamaño y composición de secuencias de los *knobs*, siendo estas características variables entre las razas. Estos patrones de hibridación permitieron graficar idiogramas DAPI-FISH para describir los cariotipos distintivos de cada raza (Figura 4.2C). Estos datos junto al conocimiento del contenido de ADN y la frecuencia de cromosomas B permitió la caracterización citogenética completa de cada raza estudiada. Esta interesante metodología puede emplearse también en la caracterización y el reconocimiento de líneas e híbridos comerciales de maíz.

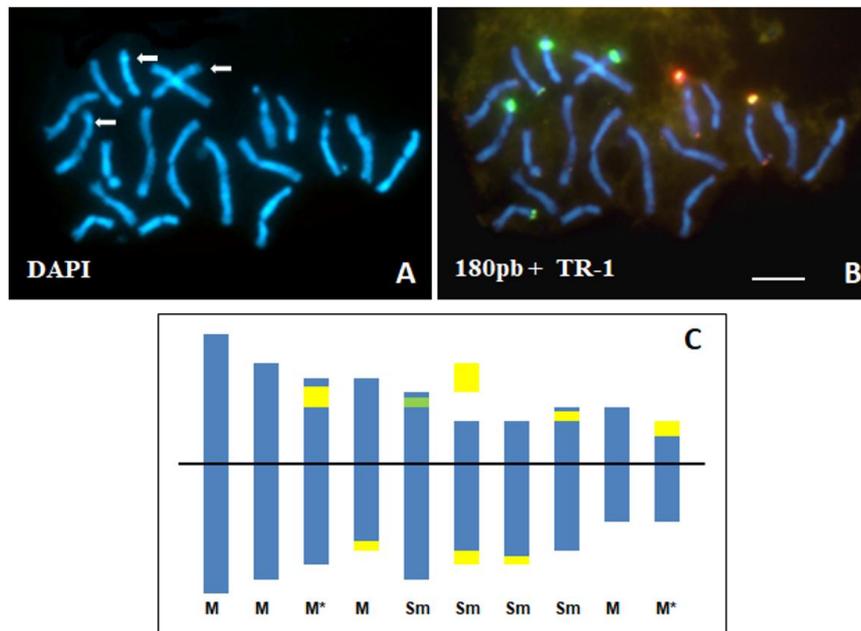


Figura 4.2. FISH sobre metafase mitótica de maíz raza Garrapata. **A.** DAPI, flechas blancas: *knobs*. **B.** FISH con las secuencias *knob* 180-pb (verde) y TR-1 (rojo), en amarillo los *knobs* hibridados con ambas secuencias. Barra: 10 μ m. **C.** Idiograma DAPI-FISH de raza Garrapata; bloques amarillos: *knobs* compuestos sólo por 180-pb, bloques verdes: *knobs* formados por ambas secuencias, la línea horizontal representa la posición del centrómero, las letras indican la morfología cromosómica (M: metacéntrico, Sm: submetacéntrico) y el asterisco denota la heterocigosis para presencia de *knob*. Fuente: M. Florencia Fourastié y Graciela E. González.

En cuanto a los experimentos de FISH en teosintes, *Z. perennis* ($2n=40$), la especie con el menor contenido de ADN por genoma básico del género, no presentó bandas DAPI+ ni señales de hibridación con las secuencias de los *knobs*. Esto muestra que la disminución del tamaño del genoma en esta especie se debió principalmente a la pérdida de las secuencias repetitivas de los *knobs* durante su proceso de poliploidización secundaria. Por el contrario, *Z. luxurians* ($2n=20$) posee el mayor contenido de ADN por genoma básico del género, debido a que presenta el mayor número y tamaño de *knobs*.

Lo antes mencionado demuestra cómo la combinación de métodos citogenéticos clásicos y moleculares permitió la caracterización citogenética y aportó al conocimiento de la variabilidad fenotípica y genotípica de *Zea*. Otro ejemplo lo constituye la caracterización citogenética de especies argentinas de cactus pertenecientes al género *Opuntia*. Todos estos datos resultan de gran utilidad para programas de mejoramiento genético y de conservación de la biodiversidad.

Por su parte, el GISH revela las homologías específicas del ADN y la distribución física de las secuencias repetidas que comparten dos taxones, y permite el reconocimiento de especies parentales en híbridos y poliploides, lo que resulta fundamental en estudios evolutivos y taxonómicos. Mediante GISH se estudiaron las homologías y divergencias genómicas entre los taxones de *Zea* y se corroboró el origen poliploide del género. Estos experimentos mostraron la alta afinidad genómica que el maíz posee con *Z. mays* ssp. *mexicana* y con su propuesto progenitor silvestre *Z. m.* ssp. *parviglumis*, ya que se observaron fuertes señales de hibridación del ADN de estos teosintes a lo largo de todos los cromosomas del maíz (Figura 4.3). Por otra parte, cuando el ADN de *Z. m.* ssp. *huehuetenanguensis* se hibridó sobre los cromosomas de maíz se observó una menor homología entre ambos taxones. Al hibridar el ADN de *Z. luxurians* se observaron señales de hibridación homogéneas sobre todos los cromosomas de maíz, mostrando alta homología entre estas dos especies. Sin embargo, una menor afinidad genómica fue detectada entre el maíz y *Z. diploperennis*, especialmente en las regiones *knob*. El patrón de hibridación del ADN de *Z. perennis* sobre los cromosomas de maíz permitió postular que ambas especies poseen un genoma parental no compartido. Las zonas divergentes reveladas en estos experimentos, zonas de no hibridación, no se distribuyen sobre genomas parentales/ancestrales enteros (p.ej. sobre 10 cromosomas), esto demuestra que los genomas ancestrales habrían sufrido procesos de reestructuración y/o evolución coincidente incompleta.

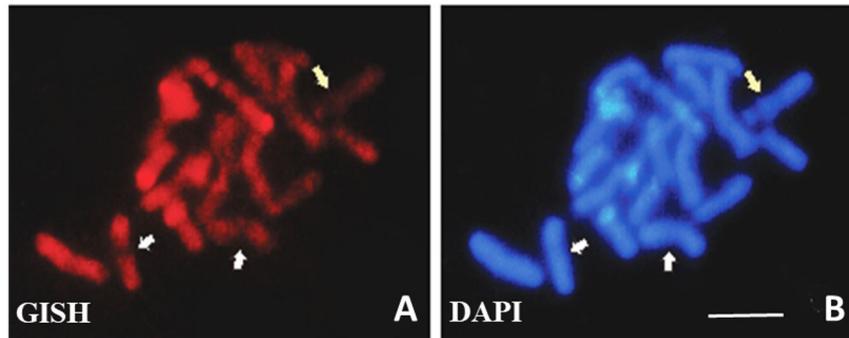


Figura 4.3. GISH sobre metafase mitótica de maíz. **A.** Patrón de hibridación con ADN genómico total de *Zea mays* ssp. *parviglumis* (rojo). **B.** Contratinción con DAPI. Las flechas muestran un brazo cromosómico y regiones centroméricas sin señales de hibridación, no homólogas. Barra: 10 μ m. Fuente: Graciela E. González.

Todos los resultados obtenidos mediante la aplicación de distintas metodologías citogenéticas permitieron entender la organización genómica y la diversificación de las especies de *Zea*, aportando nuevas claves para el estudio del origen del maíz domesticado.

Aplicación de la técnica de FISH para la identificación de aberraciones cromosómicas que involucran secuencias teloméricas

Tipos de sondas para FISH. Las sondas “PNA”

Como se mencionó en la sección anterior, la técnica de FISH, mediante la identificación de secuencias específicas de ADN *in situ* (en cromosomas en metafase o núcleos en interfase), con una sonda (secuencia complementaria de ácido nucleico) marcada con un colorante fluorescente, permite visualizar -mediante un microscopio de fluorescencia- la ubicación de esas secuencias. Las sondas disponibles comercialmente corresponden casi exclusivamente a sondas para cromosomas humanos (es muy poco frecuente encontrar sondas para otros mamíferos) pero afortunadamente, algunas de las sondas para humanos también pueden aplicarse con éxito en las células de otras especies de vertebrados. Asimismo, si bien la mayor parte de las sondas son de ADN, desde hace varios años contamos con sondas de tipo PNA (del inglés “Peptide Nucleic Acid”), que son similares a las sondas de ADN pero cuyo esqueleto azúcar-fosfato ha sido reemplazado por un esqueleto de poliamida, de carga neutra y flexible y altamente resistente a la degradación por DNAsas, RNAsas, proteinasas y peptidasas. Debido a su esqueleto neutro, las sondas de tipo PNA penetran en el cromosoma en lugar de pegarse a su superficie -como lo hace una sonda de ADN convencional, que tiene carga negativa- lo cual resulta en una eficiencia mucho mayor en la detección de secuencias que una sonda convencional. Actualmente, se pueden conseguir sondas de tipo PNA para detectar simultáneamente todos los centrómeros (pancen-

tromérica) y los telómeros (pantelomérica) presentes en los cromosomas de una célula humana. No obstante, debido a su similitud de secuencia, la sonda pancentromérica puede ser utilizada también en algunos primates no humanos, mientras que la sonda pantelomérica puede ser utilizada para detectar los telómeros de los cromosomas de cualquier especie de vertebrado, como veremos más adelante. En esta sección del presente capítulo, nos concentraremos en analizar la aplicabilidad de la técnica de FISH con sonda PNA pantelomérica para la identificación de telómeros y secuencias teloméricas intersticiales (STI) y su importancia para evaluar el daño cromosómico inducido por un mutágeno en los cromosomas de vertebrados. Para ello, primeramente definiremos qué son los telómeros y las secuencias teloméricas intersticiales.

Telómeros y secuencias teloméricas intersticiales (STI)

Telómero (del griego, *telo* = extremo, y *mero* = parte) es un término acuñado en 1938 por el genetista alemán Hermann Joseph Müller, para describir a los extremos de los cromosomas. Sin embargo, el concepto de “telómero” se utilizaba en esa época no sólo para referirse a los extremos físicos de los cromosomas, sino también a “un gen terminal con una función especial, la de sellar el extremo del cromosoma”. Por ello, los telómeros fueron definidos primeramente como las regiones terminales o extremos físicos de los cromosomas eucarióticos, que protegen a los mismos de la fusión con otros cromosomas (ya sea con un fragmento cromosómico o con uno o ambos extremos de otro cromosoma). Es decir, se aceptaba que el cromosoma tenía dos extremos y que los mismos debían tener necesariamente una función protectora. Hoy en día, a partir de diversos estudios de biología molecular, los telómeros son definidos como complejos nucleoproteicos ubicados en los extremos físicos de los cromosomas eucarióticos lineales que mantienen la estabilidad e integridad de los mismos, protegiéndolos de la degradación por nucleasas y de la recombinación y fusión con otros cromosomas.

Los telómeros están compuestos por ADN (de secuencia variable, según el organismo de que se trate), ARN (denominado TERRA, por su significado en inglés *Telomeric Repeat Containing RNA*, pues contiene repetidos de secuencia UUAGGG) y proteínas asociadas (el denominado complejo shelterina o telosoma, formado por seis proteínas, a las que se asocian además, varias proteínas relacionadas con la respuesta celular al daño y reparación del ADN). En todos los vertebrados, el ADN telomérico está formado por repeticiones del hexanucleótido TTAGGG, por lo cual la sonda pantelomérica que se utiliza en cromosomas humanos también puede ser utilizada para detectar los telómeros o secuencias teloméricas intersticiales en los cromosomas de cualquier otra especie de vertebrado e incluso de otras especies de animales no vertebrados o de especies vegetales que contengan la secuencia TTAGGG.

Dada la función del telómero, el mantenimiento de la misma es fundamental para la estabilidad genómica y la viabilidad celular. En efecto, las células que presentan telómeros

disfuncionales –ya sea debido a desprotección o erosión o acortamiento excesivo de los mismos– experimentan senescencia, muerte celular o inestabilidad genómica, fenómeno este último estrechamente ligado con el proceso de cáncer. Dado que los telómeros se acortan durante las sucesivas divisiones celulares (debido a que la enzima ADN polimerasa no es capaz de copiar el ADN de los extremos cromosómicos), existe una enzima denominada telomerasa que compensa el acortamiento, sintetizando repetidos teloméricos utilizando un ARN propio como templado o molde para dicha síntesis. Esta enzima se halla presente en líneas celulares inmortales, células de la línea germinal, células madre, linfocitos activados y la mayoría de las células tumorales y se encuentra inactiva en la mayoría de las células somáticas (de ahí el acortamiento progresivo de los telómeros en estas células).

Habitualmente, los repetidos teloméricos se localizan en los extremos o regiones terminales de los cromosomas, formando los verdaderos telómeros. Sin embargo, algunas especies de vertebrados presentan bloques de repetidos TTAGGG localizados en regiones no terminales de los cromosomas, constituyendo las denominadas “secuencias teloméricas intersticiales” (STI). Las STI pueden localizarse en la región pericentromérica o entre el centrómero y el telómero del cromosoma en cuestión (Figura. 4.4). Generalmente, se supone que la presencia de STI en los cromosomas es el resultado de fusiones cromosómicas en tándem (telómero-telómero) que han ocurrido durante la evolución de los organismos, aunque actualmente existen otras hipótesis acerca del origen evolutivo de estas secuencias. Si bien existen distintos tipos de STI (según su tamaño y organización), en la mayor parte de los vertebrados que presentan estas secuencias, las mismas aparecen como grandes bloques de posición centromérica o pericentromérica, pudiendo ocupar cientos de pares de bases de ADN. En general, se admite que las STI no representan verdaderos telómeros, es decir, telómeros funcionales. Sin embargo, debido a que los bloques de STI suelen colocalizar con sitios de ruptura, fragilidad y recombinación, se supone que estas secuencias juegan un rol importante en la formación de aberraciones cromosómicas inducidas, en la inestabilidad genómica y en la evolución cariotípica. En particular, las STI heterocromáticas -que forman los grandes bloques de STI en los cromosomas de vertebrados- están involucradas en fusiones, fisiones e inversiones cromosómicas, promoviendo la formación de nuevos telómeros y pueden experimentar diversos tipos de reordenamientos, incluyendo ruptura, amplificación, translocación o delección, lo cual puede conducir al desarrollo de nuevos cariotipos y nuevas especies, favoreciendo el proceso de evolución cariotipo.

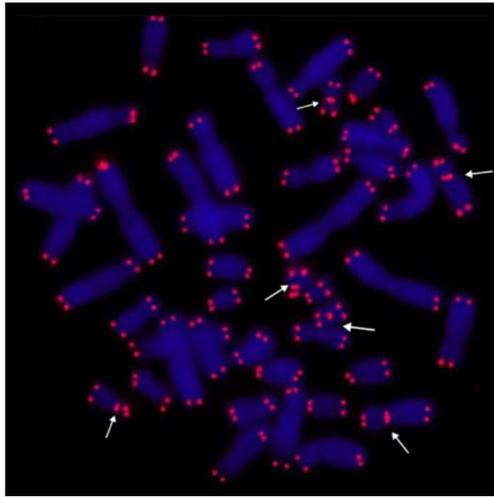


Figura 4.4. Fotografía de una célula en metafase de una línea celular derivada de piel de conejo doméstico, obtenida mediante microscopía de fluorescencia luego de aplicar la técnica de FISH con sonda pantelomérica de tipo PNA. Se observan en color rojo las señales teloméricas, tanto terminales (se observan las características 4 señales por cromosoma, 2 por cada extremo) como intersticiales (señaladas con flechas). Fuente: Alejandro Bolzán.

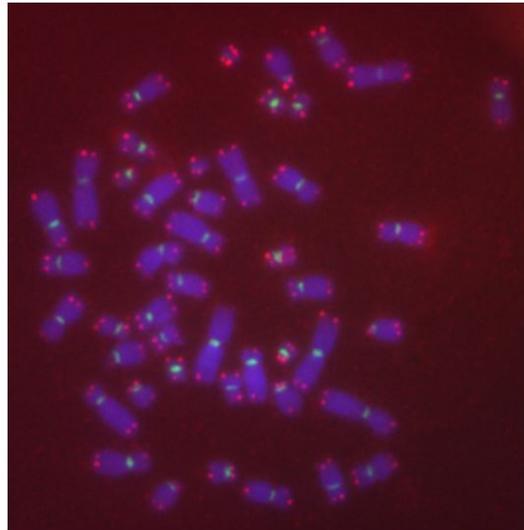


Figura 4.5. Fotografía de una célula en metafase de una línea celular derivada de linfocitos humanos, obtenida mediante microscopía de fluorescencia luego de aplicar la técnica de FISH con sondas pantelomérica (señal roja) y pancentromérica (señal verde) de tipo PNA. En este caso, no existen cromosomas con STI. Nótese que al utilizar los dos tipos de sondas, la identificación de cada cromosoma es mucho más precisa que en caso de utilizar solamente la sonda pantelomérica. Fuente: Alejandro Bolzán.

Detección de secuencias teloméricas en los cromosomas de vertebrados y su utilidad para evaluar el daño cromosómico inducido por un mutágeno

Si bien es posible estudiar a los telómeros utilizando la llamada “técnica de bandeo T”, ésta provee información limitada acerca de los reordenamientos cromosómicos que involucran a los telómeros, ya que no permite obtener información precisa a nivel molecular (es decir, sobre el ADN telomérico y en particular sobre la distribución de las secuencias teloméricas en los cromosomas). Hoy en día, a partir de los avances producidos en lo que se

denomina “citogenética molecular” (el estudio de los cromosomas y sus anomalías utilizando secuencias de ADN marcadas con un colorante fluorescente), el estudio citogenético de los telómeros y sus aberraciones se lleva a cabo por FISH. En este caso, se trata de una sonda con la secuencia de ADN complementaria a la de los telómeros que, si bien varía en los distintos grupos, en todos los vertebrados consiste en el hexanucleótido TTAGGG repetido n veces. De este modo, mediante el uso de una sonda telomérica marcada con un colorante fluorescente, es posible identificar la ubicación precisa en cada cromosoma, de las secuencias de ADN que forman parte del telómero (recordemos que el telómero es una estructura que contiene además proteínas y ARN). La sonda que se utiliza para estudiar a los telómeros, se denomina generalmente “pantelomérica” (del griego, *pan* = todo), pues permite identificar simultáneamente a todos los telómeros de los cromosomas de una célula. Obviamente, la misma sonda puede ser utilizada para detectar a las STI que puedan estar presentes en la metafase en cuestión, dado que la secuencia de bases, tanto para el caso de los verdaderos telómeros como de las STI, es la misma. Es importante señalar que las sondas comerciales que habitualmente son identificadas como teloméricas o telómero-específicas, son en realidad sondas que hibridan con regiones subtelo-méricas de cromosomas específicos, pero no con el ADN telomérico. Las sondas PNA son de elección para estudiar a los telómeros y las STI, no solamente por su eficiencia de hibridación, sino también porque su emisión es directamente proporcional al número de repetidos teloméricos presentes, lo cual permite determinar la longitud telomérica o el tamaño de las regiones ricas en STI de los cromosomas bajo estudio. Esta variante de la técnica de FISH se denomina Q-FISH (por *Quantitative FISH*) o FISH cuantitativo.

Los estudios de las aberraciones que involucran a los telómeros y STI se llevan a cabo en la etapa de metafase, es decir, cuando los cromosomas se hallan en su máximo grado de condensación y son por ello fácilmente visibles e identificables. Una vez aplicada la técnica de FISH con sonda pantelomérica, cada cromosoma presenta normalmente cuatro señales fluorescentes (Figuras 4.4 y 4.5), correspondientes cada una al telómero -más precisamente al bloque o agrupamiento de secuencias repetidas de ADN telomérico- de cada cromátida y brazo cromosómico.

Cuando un agente mutagénico (físico, químico o biológico) produce daño cromosómico, los telómeros y las STI -si las hubiera- pueden verse afectados, lo cual queda expresado en diferentes tipos de aberraciones cromosómicas. En el caso particular de los telómeros, se denomina “inestabilidad telomérica” a la inestabilidad cromosómica producida ya sea por la pérdida de extremos cromosómicos (uno o ambos) o por la disfunción (mal funcionamiento) de los telómeros. En efecto, la inestabilidad telomérica puede surgir cuando un cromosoma, debido a una ruptura en uno o ambos extremos, pierde uno o ambos telómeros (es decir, se vuelve un “cromosoma incompleto”) (Figura 4.6A) y, por lo tanto, los extremos del cromosoma “cortado” o roto quedan expuestos a la acción de enzimas que pueden degradarlos o tienden a fusionarse con los extremos de otro cromosoma. En este caso, hablamos de inestabilidad telomérica por pérdida de telómeros o extremos cromosómicos.

Alternativamente, puede suceder que uno o ambos telómeros del cromosoma en cuestión se acorten en exceso (más allá del acortamiento natural de los telómeros que ocurre habitualmente en las células somáticas a lo largo del tiempo), lo cual predispone a los cromosomas a fusionarse o asociarse entre sí. Esto puede afectar a cualquiera de los cuatro telómeros de un cromosoma en metafase, dando lugar a cromosomas con fragmentación (duplicación) o pérdida de señales teloméricas (cada señal de FISH representa un bloque o conjunto específico de secuencias teloméricas) (Figuras 4.6F y 4.6G). También puede darse el caso de que se altere o pierda alguna de las proteínas teloméricas o el ARN telomérico. En estos casos hablamos de inestabilidad telomérica por disfunción del telómero, pues el mismo, si bien presente, ha perdido su función protectora, ya sea por acortamiento excesivo (proceso llamado “erosión telomérica”) o por pérdida o alteración de sus proteínas o del ARN asociado al ADN telomérico. Este fenómeno puede ser estudiado a nivel citogenético mediante FISH y resulta visible a través de aberraciones cromosómicas tales como fusiones teloméricas, asociaciones teloméricas o la pérdida o duplicación de señal telomérica (Figs. 4.6B, F y G).

Dependiendo entonces del efecto que un determinado mutágeno pueda tener sobre los cromosomas, aparecen distintos tipos de aberraciones estructurales a nivel telomérico (Tabla 4.1 y Figura 4.6). Asimismo, la disminución de la longitud telomérica puede estar asociada al aumento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas numéricas. Entre las aberraciones estructurales que involucran a los telómeros se destacan los cromosomas incompletos (es decir, que han perdido uno o ambos extremos) (Figura 4.6A), los fragmentos acéntricos (sin centrómero) en sus distintas variantes (terminal, intersticial o compuesto) (Figuras 4.6C, D y E), las asociaciones o fusiones teloméricas y la amplificación o translocación de secuencias teloméricas (Figuras 4.6B, H e I). De este modo, mediante el estudio citogenético de los telómeros, es posible determinar si las células bajo estudio presentan sus telómeros funcionalmente estables o inestables (ya sea por pérdida o disfunción). Asimismo, es posible determinar si las células presentan STI, lo cual aporta información adicional sobre los posibles reordenamientos cromosómicos presentes en la célula y sus mecanismos de formación (mayormente fusiones o fisiones cromosómicas). Obviamente, la determinación de las aberraciones que involucran a los telómeros es más precisa si se utiliza además una sonda pancentromérica, pues esto permite identificar con precisión si estamos en presencia de un cromosoma (ya sea con uno o más centrómeros) o de un fragmento cromosómico (acéntrico, es decir, sin centrómero). En cuanto a las aberraciones cromosómicas que involucran a las STI, podemos encontrar translocación (Figura 4.6I), amplificación (Figura 4.6H), pérdida o fragmentación de los bloques ricos en dichas secuencias.

Tabla 4.1: Listado de los distintos tipos de aberraciones cromosómicas que involucran a los telómeros y secuencias teloméricas intersticiales (STI)

1) Aberraciones que involucran directamente a los extremos cromosómicos y, como consecuencia de ello, a las secuencias teloméricas terminales. Involucran la pérdida de uno o más telómeros, como consecuencia de rupturas cromosómicas a nivel de los extremos cromosómicos.

-Cromosomas incompletos (cromosomas que pierden uno o ambos extremos).

-Fragmentos acéntricos terminales (es decir, que derivan de rupturas en los extremos del cromosoma). Estos fragmentos pueden unirse y formar un fragmento combinado o compuesto. Asimismo, existen fragmentos acéntricos derivados de dos rupturas a nivel de la región intersticial de los cromosomas, por lo cual carecen de telómeros y son denominados intersticiales.

-Cromosomas dicéntricos o multicéntricos (con más de dos centrómeros) que han perdido uno o ambos extremos.

2) Aberraciones cromosómicas que involucran directamente a las secuencias teloméricas terminales o propiamente dichas e implican disfunción telomérica. No hay involucrado un evento de ruptura cromosómica.

-Pérdida o multiplicación (generalmente por duplicado o triplicado) de uno o más telómeros (entendiendo como tal al grupo de secuencias de ADN telomérico del cromosoma, el cual se identifica citogenéticamente mediante FISH como una señal fluorescente) del cromosoma.

-Asociación telomérica (señales de FISH muy juntas, pero no unidas; se observan entonces cuatro señales de FISH en el sitio de la asociación).

-Fusión telomérica (con o sin señales de FISH en el sitio de fusión o unión de los cromosomas).

-Intercambios de cromátidas hermanas a nivel telomérico (lo que indica un evento de recombinación a nivel telomérico).

-Translocación de secuencias teloméricas terminales.

-Amplificación de secuencias teloméricas terminales.

3) Aberraciones cromosómicas que involucran a las secuencias teloméricas intersticiales (STI).

-Translocación o cambio de posición de STI.

-Amplificación o incremento en el número o en el tamaño del bloque de STI.

-Pérdida de STI.

-Fragmento intersticial (derivado de rupturas a nivel de la región centromérica o pericentromérica de un cromosoma que contiene uno o más bloques de STI).

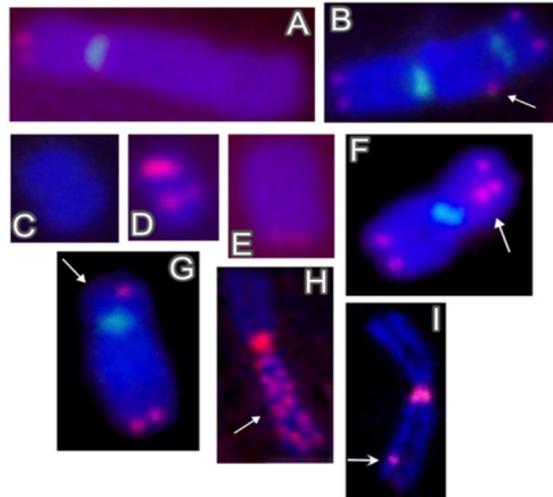


Figura 4.6. Ejemplos de aberraciones cromosómicas que involucran a los telómeros y STI: A-G, cromosomas humanos; H e I, cromosomas de hámster chino, con STI pericentroméricas. **A.** Cromosoma incompleto; **B.** Fusión telomérica (cromosoma dicéntrico) con una sola señal intersticial; **C.** Fragmento acéntrico terminal; **D.** Fragmento acéntrico compuesto; **E.** Fragmento acéntrico terminal; **F.** Duplicación de señal telomérica; **G.** Pérdida de señal telomérica; **H.** Amplificación de secuencias teloméricas intersticiales; **I.** Translocación de secuencias teloméricas intersticiales. Fotografías obtenidas mediante microscopía de fluorescencia luego de aplicar la técnica de FISH con sondas pantelomérica (señal roja) y/o pancentromérica (señal verde) de tipo PNA. Las flechas blancas señalan el sitio o región del cromosoma donde se produjo la aberración. Fuente: Alejandro Bolzán.

Aplicabilidad de la técnica de FISH con sonda pantelomérica: conclusiones

Como vemos, entonces, la aplicación de la técnica de FISH con sonda pantelomérica en extendidos cromosómicos permite no sólo detectar a los telómeros y las STI, sino también determinar si una célula presenta o no inestabilidad telomérica y si la misma es debida a ruptura del cromosoma o a disfunción del telómero. Asimismo, si la sonda es de tipo PNA, se puede determinar la longitud telomérica o el tamaño de las regiones ricas en STI, según corresponda.

En conclusión, el estudio citogenético de los telómeros mediante la técnica de FISH permite determinar con mayor precisión que las técnicas citogenéticas convencionales el daño inducido a nivel cromosómico por un mutágeno dado (mediante la identificación de las aberraciones cromosómicas listadas en la Tabla 4.1) y si un agente mutagénico induce inestabilidad telomérica, ya sea por pérdida de extremos cromosómicos o por disfunción telomérica.

Por otra parte, las STI juegan un rol importante en la inestabilidad genómica y la evolución cromosómica, especialmente en los vertebrados, dada su relación con reordenamientos cromosómicos y sitios frágiles. Así, por ejemplo, en nuestro país se han llevado a cabo estudios sobre distribución de secuencias teloméricas y evolución cromosómica en roedores, armadillos, monos del nuevo mundo y tortugas. A lo anterior, cabe agregar el estudio realizado en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires sobre distribución de secuencias teloméricas en los cromosomas de escorpiones. Dichos estudios han permitido establecer nuevas conclusiones respecto de la evolución cariotípica de las especies estudia-

das. De este modo, la técnica de FISH con sonda pantelomérica puede también utilizarse para estudiar la evolución cariotípica de diversas especies.

Caracterización citogenética en primates en cautiverio

Aspectos generales

Otra aplicación de la Citogenética es su rol fundamental en la conservación de la biodiversidad. La Biología de la Conservación es una actividad multidisciplinaria, que aplica los principios básicos de la Ecología, Sistemática, Biogeografía y Genética junto con los de otras disciplinas no biológicas, como la Economía, Sociología, Antropología y la Filosofía, con el objetivo de mantener la diversidad biológica en el planeta. Estudia las especies, comunidades y ecosistemas directa o indirectamente perturbados por la actividad humana. Permite comprender los procesos que mantienen la diversidad biológica y ayuda a definir las formas de preservarla.

La conservación de las especies es una tarea desafiante debido a las constantes amenazas a la biodiversidad, tales como el deterioro de sus hábitats naturales por la acción antrópica o la caza para el tráfico de fauna. A pesar de que la “Conservación *in-situ*” (entendida como el proceso de proteger una especie en su hábitat natural) es la forma más efectiva, para ciertas especies amenazadas los programas de reproducción en cautiverio pueden ser un componente importante en el marco de un plan más abarcativo para su conservación. El mantenimiento de especies en cautiverio en zoológicos, acuarios y jardines botánicos se conoce como “Conservación *ex-situ*”. El rol de los zoológicos, centros de cría y acuarios ha cambiado en los últimos años de colecciones de plantas y animales a instituciones modernas que contribuyen activamente a la conservación, investigación científica y educación pública.

Un requisito básico para proyectar programas de manejo de fauna es contar con información taxonómica de los ejemplares, tanto si se trata de animales en cautiverio o en estado silvestre. Con los ejemplares correctamente identificados taxonómicamente, es posible armar grupos en los distintos ambientes o recintos que sean representativos de las poblaciones naturales y su diversidad. Así se contará con miembros que se podrán reproducir entre sí y a su vez, la colonia podrá sostenerse en el tiempo. Asimismo, si el objetivo es el manejo para la conservación de una dada especie, la importancia de la caracterización taxonómica radica en evitar la ocurrencia de individuos híbridos dentro de la comunidad reproductiva o de exhibición.

Por reunir especímenes de intercambio interinstitucional o proveniente de decomisos, en los zoológicos y centros de cría la procedencia geográfica de los mismos es, en general, desconocida y generalmente se recurre a caracteres fenotípicos de tipo morfométrico para la diagnosis sistemática de los ejemplares. Tradicionalmente, la identificación de ejempla-

res nuevos en ambientes de cautiverio se ha realizado a partir de características del fenotipo externo como el patrón de coloración (de plumas, placas, pelaje, escamas), tamaño corporal o fórmula dentaria, entre otras. Sin embargo, la gran variedad de fenotipos y edades, así como el estado de salud en que los especímenes llegan a la institución, en muchas oportunidades puede generar confusiones en la diagnosis.

En estos centros, cobra otro valor la caracterización genética de los ejemplares en cautiverio, ya que favorece el éxito de los cruzamientos dirigidos al seleccionar ejemplares, tanto para ampliar las colonias de cautiverio como para su correcto mantenimiento, evitando la depresión por endogamia/exogamia posible ante el desconocimiento de los parentales, potencialmente polimórficos, como es tan frecuente en especies naturales. El análisis genético permite corroborar la identificación taxonómica, complementando la información con la descripción fenotípica suministrada por el Médico Veterinario. En este contexto, el cariotipo constituye una variable a considerar para el adecuado manejo de especies en planes de conservación contribuyendo a corroborar el estatus taxonómico de los ejemplares.

Los primates constituyen una importante proporción de los ejemplares en cautiverio, ya sea en zoológicos para su exhibición, como en centros de investigación biomédica. Son un grupo de mamíferos notablemente heterogéneo tanto por su diversidad fenotípica como por su distribución geográfica y hábitos. Las formas actuales del Orden Primates que comprenden dos subórdenes, Strepsirrhini, (que incluye a los lemúridos, quirogaleidos, lorísidos, aye-ayes, índridos y gálagos), y los Haplorrhini, que agrupa a los Tarsiformes, a los Primates del Nuevo Mundo (Platyrrhini) y a los Primates del Viejo Mundo (Catarrhini), incluyendo en este último grupo a los Hominoidea. Esta heterogeneidad encuentra su correlato a nivel cariológico. En primates no humanos se ha observado una amplia diversidad cromosómica, con números diploides ($2n$) que van desde $2n=16$ en el mono tití negro *Callicebus lugens* hasta $2n=80$ en el tarsero de Horsfield, *Tarsius bancanus*. La inmensa variedad de cariotipos ya descritos provee importante evidencia acerca del posible papel que desempeñarían los rearrreglos cromosómicos en los cambios evolutivos experimentados por los primates hasta llegar a las formas actuales hoy en análisis.

A continuación, brindaremos algunos ejemplos de cómo la Citogenética colabora en el manejo de estos primates en zoológicos y centros de cría.

El caso del género *Saimiri*

Un género de Primates Neotropicales frecuentemente encontrado en zoológicos son los monos ardilla, *Saimiri sp.* Si bien esta especie no llega en su distribución a nuestro país, es la frecuentemente encontrada en zoológicos argentinos debido a su relativa abundancia en hábitats naturales, su facilidad de manejo y al creciente tráfico de esta especie con fines comerciales.

Dentro del género se distinguen dos tipos morfológicos basados en diferencias en el parche circumocular (Figura 4.7A): el tipo Gótico (Grupo *Saimiri sciureus*) y el tipo Romano (Grupo

Saimiri boliviensis). Ambos patrones faciales mostraron diferencias no sólo morfológicas, sino también comportamentales. Esta distinción es dificultosa para el ojo inexperto, sobre todo en el caso de los animales que llegan a los zoológicos en muy mal estado de salud, y puede ser ambigua en híbridos y animales producto de retrocruza.

Todas las especies de este género poseen un número diploide de 44 cromosomas, difiriendo sus cariotipos por distintas inversiones pericéntricas que causan variaciones en la relación cromosomas unbraquiados (acrocéntricos) / bibraquiados (metacéntricos y submetacéntricos).

Se divide el cariotipo de *Saimiri sp.* en tres grupos de autosomas y el par sexual XY

- a) Cromosomas metacéntricos (pares A1 a A5)
- b) Cromosomas submetacéntricos (pares B1 a B11)
- c) Cromosomas acrocéntricos (pares C1 a C7)

Esta forma de ordenar el cariotipo permite diferenciar a simple vista los cariotipos de las distintas especies. De acuerdo con este ordenamiento, los pares cromosómicos involucrados en las inversiones serían los pares B5/C1 y B10/C2. El par B5 se originaría por una inversión pericéntrica en el par C1 (Figura 4.7B). El par B10 se originaría de la misma manera por una inversión pericéntrica en el par C2.

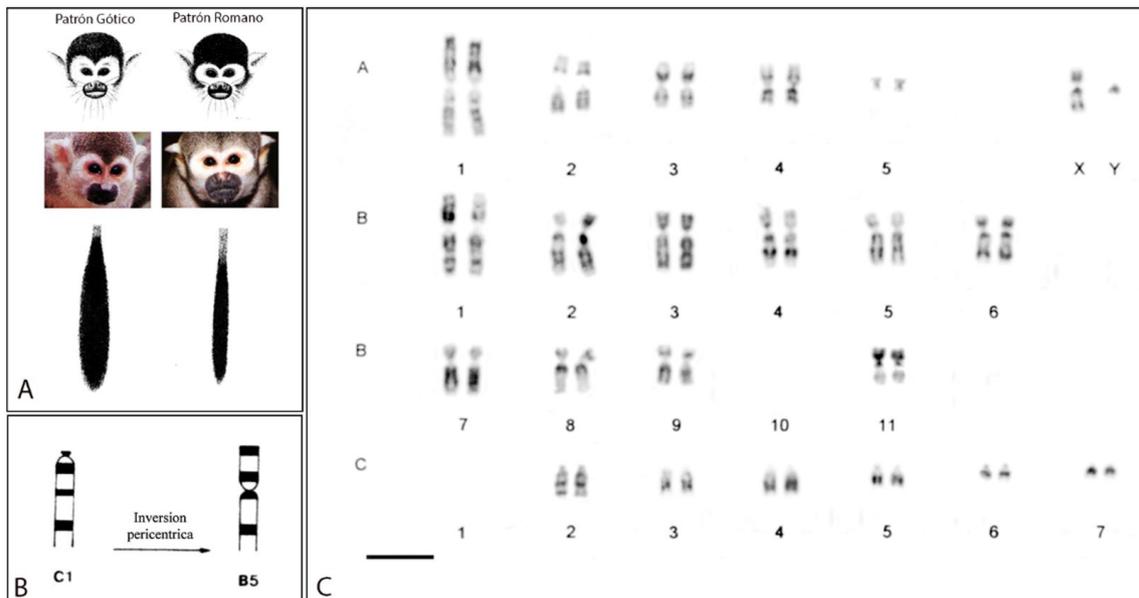


Figura 4.7. A. Patrones del arco facial en los tipos Gótico y Romano y diferencias en el extremo de la cola. Modificado de Hershkovitz (1984), con fotografías color de Rowe (1996). B. Inversión pericéntrica involucrada en el cambio cromosómico C1 a B5 (Modificada de García et al. (1979); C. Metafase con bandas G de *Saimiri boliviensis boliviensis* $2n = 44$, XY. Esta especie posee 6 pares cromosómicos acrocéntricos y 15 pares cromosómicos metacéntricos/submetacéntricos y su cariotipo posee los pares cromosómicos B5 y C2 pero carece de los pares B10 y C1 (nótese los espacios en blanco en el cariotipo) que sí están en otras especies, tales como *S. sciureus sciureus*. Barra = 10 μm. Fuente: Eliana R. Steinberg.

De esta forma para los *Saimiri sp.* que presentan el patrón facial gótico se han registrado, por ejemplo, en *S. s. sciureus* 7 pares cromosómicos unibraquiados y 14 bibraquiados y para el patrón facial romano se han registrado para *S. b. boliviensis* 6 pares unibraquiados y 15 pares bibraquiados. En el ejemplo de la figura 4.7C, *S. b. boliviensis* posee 6 pares cromosómicos acrocéntricos y 15 pares cromosómicos metacéntricos/submetacéntricos y su cariotipo posee los pares cromosómicos B5 y C2 pero carece de los pares B10 y C1 (nótese los espacios en blanco en el cariotipo armado) que sí están en otras especies, tales como *S. sciureus sciureus*.

Estas inversiones pericéntricas, al ser la causa de las diferencias en el cariotipo de las distintas especies, permiten reconocer la posible existencia de híbridos, tanto en la naturaleza como en cautiverio. El manejo genético de los ejemplares es de vital importancia para el éxito a largo plazo de los programas de conservación *ex-situ* de esta especie. El establecimiento de colonias mixtas lleva consigo el riesgo de disminución del éxito reproductivo de los ejemplares híbridos, así como el riesgo de depresión por endogamia si no se selecciona adecuadamente a los parentales. Por otro lado, se ha reportado la aparición de híbridos naturales entre *S. s. macrodon* y *S. b. peruviansis* en Pucallpa, Perú, los cuales poseen 11 cromosomas acrocéntricos. En este marco, cobra otro valor la caracterización cariotípica de todas las especies del género, que luego de este análisis, pone en evidencia la necesidad de considerar todos los polimorfismos para así identificar correctamente la procedencia y origen de híbridos tanto de vida silvestre como de cautiverio.

Sistemas cromosómicos de determinación sexual y estudios meióticos

En el orden Primates, el sistema de determinación sexual más frecuentemente observado es el XX/XY. Sin embargo, como modificaciones a este sistema ancestral, encontramos translocaciones Y-autosoma que generan lo que se denomina sistemas cromosómicos de determinación sexual múltiple o sistemas sexuales múltiples (Figura 4.8A).

Estos sistemas sexuales múltiples se han verificado en diversos géneros de Primates Neotropicales. Los monos aulladores, género *Alouatta sp.*, constituyen un interesante ejemplo dado que se han descrito sistemas sexuales múltiples en los machos de tipo: 1) $X_1X_2X_3Y_1Y_2$ (observándose en Meiosis I una cadena de 5 elementos o pentavalente) en *A. guariba clamitans* (Figura 4.8B), 2) $X_1X_2Y_1Y_2$ (observándose en Meiosis I una cadena de 4 elementos o cuadrivalente) en las especies *A. seniculus*, *A. caraya* and *A. pigra* ; 3) X_1X_2Y (que forma una cadena de 3 elementos o trivalente en Meiosis I) en *A. belzebul* y *A. palliata* (Figura. 4.8C).

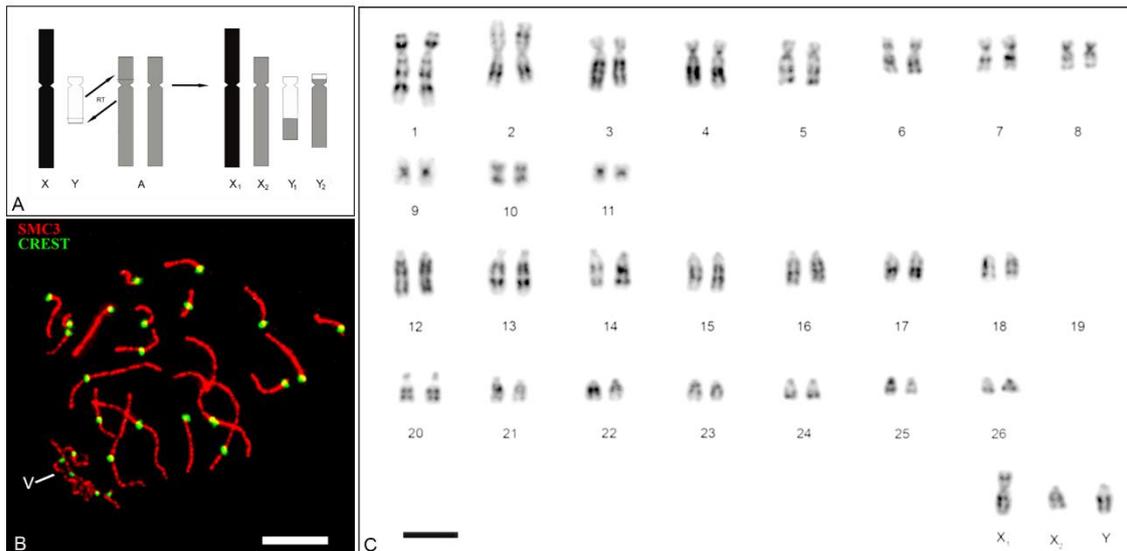


Figura 4.8. **A.** Posible origen para un sistema de determinación sexual múltiple $X_1X_2Y_1Y_2$ a partir de una translocación recíproca Y-autosoma (RT). El X ancestral se muestra de color negro, el cromosoma Y ancestral blanco y el par autosómico involucrado se muestra de color gris oscuro. A partir de un sistema de tipo XY, roturas simultáneas en A_{prox} y en la región distal de Yq , seguido de una translocación recíproca entre ellos, habría dado lugar a los cromosomas Y_1 e Y_2 . El cromosoma homólogo del par A que no estuvo involucrado en la translocación constituiría el cromosoma X_2 y el X ancestral se denominaría ahora X_1 ; **B.** Inmunodetección en un espermatocito en Paquitene de *Alouatta guariba clamitans* mostrando la presencia de 5 centrómeros en el multivalente sexual. Los ejes del complejo sinaptonémico están marcados en rojo (SMC3) y los centrómeros en verde (CREST). La línea indica en pentavalente sexual (V) donde se observan 5 señales centroméricas. Barra = 10 μm ; **C.** Metafase con bandas G de un macho de *A. palliata* $2n = 53$, X_1X_2Y . Se observa el sistema sexual de tipo trivalente X_1X_2Y , formado por una translocación entre el par cromosómico 19 y el cromosoma Y. Barra = 10 μm . Fuente: Eliana R. Steinberg.

Dada esta diversidad, el patrón de determinación sexual constituiría un carácter con valor sistemático en los Primates y en particular en los Primates Neotropicales. Con el fin de caracterizar estos sistemas, los estudios mitóticos han sido ampliamente utilizados en décadas pasadas. Sin embargo, los datos meióticos son los que permiten confirmar la cariología e identificar inequívocamente el sistema de determinación sexual. Fue así como los estudios mitóticos realizados en el mono aullador negro y dorado, *A. caraya*, utilizando técnicas de bandas cromosómicas (bandas G) indicaron que esta especie tenía un $2n=52$ y un sistema cromosómico sexual del tipo XX/XY, mientras que posteriores estudios meióticos (análisis de espermatocitos en Metafase I, observación de quiasmas, tinciones de complejo sinaptonémico bajo microscopía óptica y electrónica para estudio de sinapsis y recombinación) mostraron que esta especie poseía un cariotipo con $2n=52$ y un sistema sexual de tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y_1Y_2$, identificándose así el correcto sistema sexual de esta especie.

En este contexto, la caracterización meiótica en Primates Neotropicales es de gran utilidad en planes de conservación o de reproducción en cautiverio, dado que permite diagnosticar la normalidad o la alteración en los cromosomas sexuales y el patrón de determinación sexual de cada individuo (XX/XY o sistema sexual múltiple). Asimismo, permite analizar posibles irregularidades en el proceso meiótico que pueden interferir en la fertilidad de los individuos. Estos aspectos son de sumo interés en el manejo y armado de los grupos, en particular ante la posible presencia de híbridos. En el caso de *Alouatta* se ha descrito en vida silvestre tropas compuestas por individuos de *A. caraya* y *A. guariba clamitans*, observándose individuos con patrón

de coloración de pelaje intermedio entre ambas especies, hibridación que recientemente fuera confirmada mediante estudios genéticos. Estos estudios genéticos confirmaron la hibridación entre el mono aullador negro y dorado (*A. caraya*), que posee un número diploide $2n=52$ en ambos sexos y un sistema sexual en machos de tipo cuadrivalente $X_1X_2Y_1Y_2$, y el mono aullador marrón (*A. guariba clamitans*), que posee un sistema sexual múltiple de tipo pentavalente $X_1X_2X_3Y_1Y_2$ en los machos y distintos números diploides en cada sexo ($2n=46$ en las hembras, y $2n=45$ en los machos). La posible ocurrencia de hibridación entre dos especies cariológicamente tan diferentes, no sólo a nivel del complemento autosómico sino también a nivel de su sistema sexual, enfatiza la importancia de los estudios citogenéticos para la mejor comprensión de la sistemática y taxonomía de los Platyrrhini, al igual que en su manejo tanto en cautiverio como en vida silvestre y, en un marco más amplio aún, su conservación como parte del patrimonio de la biodiversidad de la región.

Referencias

- Bolzán, A. D. (2012). Chromosomal aberrations involving telomeres and interstitial telomeric sequences. *Mutagenesis*, 27, 1-15.
- Bolzán, A. D. (2017). Interstitial telomeric sequences in vertebrate chromosomes: Origin, function, instability and evolution. *Mutation Research*, 773, 51-65.
- Conde, D. A., Flesness, N., Colchero, F., Jones, O. R., Scheuerlein, A. (2011). An emerging role of zoos to conserve biodiversity. *Science*, 331(6023), 1390-1391.
- Fourastié, M. F., Gottlieb, A., Poggio, L., González, G. E. (2017). Are cytological parameters of maize landraces (*Zea mays* ssp. *mays*) adapted along an altitudinal cline?. *Journal of Plant Research*, 131(2), 285-296.
- Gomes, N. M., Shay, J. W., Wright, W. E. (2010). Telomere biology in Metazoa. *FEBS Letters*, 584, 3741-3751.
- González, G. E., Fourastié, M. F., Poggio, L. (2013) Número y composición de secuencias de los knobs (DAPI-FISH) y su utilidad en la caracterización de accesiones de maíz y teocintle. *Revista de Fitotecnia Mexicana*, 36, 127-135.
- González, G. E., Poggio, L. (2015) Genomic affinities revealed by GISH suggest intergenomic restructuring between parental genomes of the paleopolyploid genus *Zea*. *Genome*, 58, 433-439.
- Groves, C. P. (2001) *Primate Taxonomy* (pp. 350). Washington y Londres: Smithsonian Institution Press.
- Meyne, J., Baker, R. J., Hobart, H. H., Hsu, T. C., Ryder, O. A., Ward, O. G., Wiley, J. E., Wurster-Hill, D. H., Yates, T. L., Moyzis, R. K. (1990) Distribution of nontelomeric sites of (TTAGGG) n telomeric sequences in vertebrate chromosomes. *Chromosoma*, 99, 3-10.
- Mourthe, I., Trindade, R. A., Aguiar, L. M., Trigo, T. C., Bicca-Marques, J. C., Bonatto, S. L. (2018) Hybridization between Neotropical primates with contrasting sexual dichromatism. *International Journal of Primatology*, 40, 99-113.

- Mudry, M. D., Nieves, M., Steinberg, E. R. (2015) Cytogenetics of howler monkeys. En *Howler Monkeys: Adaptive Radiation, Systematics, and Morphology* (pp. 85-105) En Ed. M. Kowalewski, P. Garber, L. Cortés Ortiz, B. Urbani, D. Youlatos. Alemania. Berlín: Springer Verlag.
- Poggio, L., González, G. E., Confalonieri, V., Comas, C., Naranjo, C. A. (2005) The genome organization and diversification of maize and its allied species revisited: evidences from classical and FISH-GISH cytogenetics analysis. *Cytogenetics and Genome Research*, 109, 259-267.
- Potter, S. A. B., Deakin, J. E. (2018) Cytogenetics: an important inclusion in the conservation genetics toolbox. *Pacific Conservation Biology*, 24(3), 280-288.
- Realini, M. F., Poggio, L., Cámara-Hernández, J. A., González, G. E. (2018). Exploring karyotype diversity of Argentinian Guarani maize landraces: relationships among South American maize. *PLoS ONE*, 13(6), e0198398.
- Shay, J. W., Wright, W. E. (2019) Telomeres and telomerase: three decades of progress. *Nature Reviews Genetics*, 20, 299-309.
- Steinberg, E. R., Nieves, M., Fantini, L., Mudry, M. D. (2014) Primates karyological diagnosis and management programs applications. *Journal of Medical Primatology*, 43, 455-467.
- Vanderberg, J. L., Williams-Blangero, S., Moore, C. M., Cheng, M., Abee, C. R. (1990) Genetic relationships among three squirrel monkey types: Implications for taxonomy, biomedical research and captive breeding. *American Journal of Primatology*, 22, 101-111.

CAPÍTULO 5

Marcadores Genéticos: Introducción al análisis y su aplicación en diversas áreas biológicas

*Egle Etel Villegas Castagnasso, Diego Manuel Posik
y Julián Alejandro Crespi*

Los marcadores polimórficos se han utilizado desde hace décadas en diversas aplicaciones; comenzando con los marcadores fenotípicos, continuando por los bioquímicos y más recientemente a nivel del ADN. Su desarrollo e implementación fue acompañado por el incremento en el conocimiento de los procesos biológicos, convirtiéndose en una herramienta irremplazable para la resolución de una amplia gama de problemáticas. Actualmente pueden detectarse variaciones ínfimas en el material genético que resultan de utilidad en genética de microorganismos, vegetales y animales, siendo generalizada su utilización en las ciencias biológicas.

En este capítulo se hará referencia a marcas o diferencias moleculares observables con efectos a distintos niveles del flujo de la información genética, que pueden ir desde la propia secuencia del material hereditario hasta la expresión de la misma, donde entran en juego numerosos factores.

Marcadores Genéticos: Un poco de historia

Para comenzar con el abordaje de un marcador, empezaremos con el significado de la palabra marcar, la cual hace referencia a distinguir o diferenciar. Si pensamos esto en el contexto de una población, las diferencias nos permitirán distinguir entre los individuos que la conforman y también distinguirla de otras poblaciones, según el marcador utilizado, el nivel de información que ofrece y el objetivo planteado en el análisis.

Los primeros estudios de las diferencias entre individuos, se basaban en la descripción de características morfológicas. En el caso de los animales de cría, estas diferencias se expresaban señalando detalles de su aspecto externo como son el análisis de peculiaridades fenotípicas de la cabeza y de ambos flancos del animal, en los que se destacaban características distintivas como por ejemplo el color de capa, la presencia de remolinos, manchas, marcas o alguna otra particularidad. Por su parte, en los vegetales, los estudios iniciales estaban basados también en observaciones de su fenotipo como por ejemplo la altura, color de la semilla, forma

de la hoja, textura de la vaina, morfología floral, etc. Las características mencionadas anteriormente, tanto en animales como vegetales, presentaban como limitantes la influencia ambiental, el tiempo requerido para coleccionar los datos y el reducido número de caracteres involucrados en este proceso. Sumado a ello, la observación personal constituía una fuente de errores involuntarios, ya que estas descripciones subjetivas eran tomadas con criterios ambiguos, por lo que resultaban ser escasamente informativas.

Posteriormente, el desarrollo de distintas técnicas de laboratorio permitió avanzar sobre los diferentes caracteres polimórficos a analizar. Haremos aquí un paréntesis, para poder introducir el concepto de polimorfismo:

En 1965, Edmund Ford define al polimorfismo como la presencia simultánea de dos o más formas discontinuas en una especie, de manera tal que la menos frecuente de ellas no puede ser mantenida únicamente por mutación. Posteriormente, en el año 1981, Luigi Cavalli-Sforza y Walter Bodner, mencionan al polimorfismo bioquímico-genético como la existencia en una misma población de dos o más alelos en un locus, cada uno con una frecuencia apreciable. En relación a esto, debemos definir cuál es el límite válido para considerar a una variante como alelo. Desde el año 1977 y con validez en la actualidad, Lucotte considera un determinado locus como polimórfico cuando la frecuencia del alelo más común es igual o inferior a 0,99. Sin embargo esta definición puede considerarse arbitraria, ya que este valor puede variar según los valores muestrales (1%, 5%, etc.). En términos prácticos, se deben descartar aquellos alelos que aparezcan una única vez y que, por lo tanto, puedan considerarse producto de mutaciones espontáneas. De este modo el criterio que debe ser tenido en cuenta para considerar polimórfico a un locus sería que en la muestra poblacional haya al menos dos individuos heterocigotas para la variante.

Volviendo al problema de la ambigüedad que se presentaba en las descripciones fenotípicas, se destaca el aporte del trabajo que en el año 1901 presentó Carl Landsteinner, en el cual describió la variabilidad presente en los grupos sanguíneos humanos mediante el empleo de técnicas serológicas. Así, por primera vez, los individuos se podían agrupar según un criterio objetivo acuñándose el término "marcador genético" definido sencillamente como caracteres heredables con múltiples estados (alelos) en cada carácter (locus).

En la década del 50, la electroforesis (técnica que separa moléculas por su movilidad diferencial a través de un gel sometido a un campo eléctrico) comenzó a ser utilizada en estudios de diversidad poblacional. Por ejemplo, los diferentes patrones de corrida de cada proteína son heredados como características discretas y de forma codominante. El número de genes involucrado en las mismas por lo general es reducido y la influencia ambiental baja. Estos marcadores bioquímicos permiten realizar un análisis rápido de numerosas muestras de forma simultánea, con técnicas estandarizadas y de bajo costo.

Sin embargo, debemos tener en cuenta que los distintos patrones electroforéticos detectados pueden tener una base molecular compleja que puede incluir sustituciones, inserciones y pérdidas de nucleótidos. Las diferencias también pueden ser causadas por modificaciones pre y post transcripcionales y/o traduccionales.

Entre las limitaciones de los marcadores bioquímicos están el que las muestras deben ser frescas y que el nivel de observación es fenotípico, ya que estamos analizando el polimorfismo a nivel proteico. Esto hace también que el análisis de la variabilidad estudiada quede reducido a ciertas regiones del ADN codificante que conforma entre el 5 y el 15% de la totalidad del genoma, dependiendo la especie analizada.

En 1953, el biólogo estadounidense James Watson y el físico británico Francis Crick propusieron el modelo de doble hélice del ácido desoxirribonucleico (ADN). Este descubrimiento fue seguido por otros no menos importantes, como el modelo de replicación semiconservativa de Messelson y Sthal en 1958 o el aislamiento de la ADN polimerasa por Kornberg en 1960.

La primera técnica para estimar diferencias a nivel de ADN se desarrolló en la década de 1960 y se aplicó en estudios sistemáticos y de evolución molecular. Esta metodología, conocida como hibridación de ácidos nucleicos, se basa en las propiedades termodinámicas de reasociación de las cadenas simples de ADN o ARN por el cual se combinan dos cadenas complementarias simples de ácidos nucleicos y se forma una única molécula de doble cadena por apareamiento de sus bases.

Posteriormente, en el año 1985, el genetista inglés Alec Jeffrey describió la presencia de secuencias repetitivas y en tándem que difieren de un individuo a otro. Empleando el uso de enzimas de restricción que cortan el ADN en las zonas flanqueantes a estas regiones y sometiendo a una electroforesis para separar estos fragmentos, se conforma un patrón de bandas que es propio de cada individuo.

Actualmente, los avances en biología molecular han incorporado nuevos marcadores, de naturaleza molecular y de mayor sensibilidad para detectar cambios en el genotipo de los individuos, situación que ha permitido grandes avances en el área. Esta línea de descubrimientos marcó la tendencia hacia estudios cada vez más pormenorizados, teniendo como objeto de análisis la molécula de ADN, portadora de los polimorfismos en la secuencia de nucleótidos. Este avance, sumado al desarrollo de nuevas técnicas, ha permitido identificar regiones que presentan diferencias que pueden reconocerse a diferentes niveles: entre individuos, entre especies, entre grupos taxonómicos mayores, etc. Este análisis de las diferencias a nivel de la secuencia de nucleótidos nos permite definir a un marcador genético como un *segmento de ADN que presenta un polimorfismo, con una ubicación física identificable, puesto en evidencia por técnicas repetibles y cuya herencia puede rastrearse.*

Marcadores moleculares

Acerca de su localización

A diferencia de los marcadores morfológicos y bioquímicos que sólo evidencian polimorfismos de regiones codificantes, los marcadores moleculares “señalan” diferencias tanto en regiones codificantes como no codificantes, ampliando las posibilidades de análisis a la totalidad del

genoma, por lo tanto pueden encontrarse en el ADN nuclear, mitocondrial o cloroplástico. Dependiendo de su ubicación, los marcadores moleculares proveen distinto tipo de información.

Los marcadores ubicados en los autosomas tienen herencia biparental, por lo tanto, su información provendrá en forma equitativa de ambos progenitores. La información que ellos proporcionan permite su utilización en identificación individual, análisis de parentesco o genealógicos y poblacionales, entre otros. Mientras que los marcadores ubicados en cromosomas sexuales suministrarán información de acuerdo a su modo de herencia. Por ejemplo en los mamíferos las secuencias que se encuentran en la región propia del cromosoma Y permiten rastrear el linaje paterno. Los marcadores ubicados en la región propia del cromosoma X, se transmiten biparentalmente en el caso de las hembras y uniparentalmente en el caso de los machos.

A diferencia de esto, los marcadores ubicados en las mitocondrias, dado su origen materno, nos permitirán obtener información acerca de eventos que hayan sucedido en la línea de herencia materna, así los individuos que provienen del mismo linaje materno poseen el mismo ADN mitocondrial (matrilinajes). El ADN mitocondrial (ADNmt) es circular, cerrado y de doble cadena lo que le confiere mayor estabilidad, con respecto al ADN nuclear, frente a fenómenos degradativos como los que se presentan comúnmente cuando la muestra queda expuesta a condiciones desfavorables de temperatura, pH, humedad, etc. Sumado a que hay mayor número de copias por célula (100 a 1000 veces más con respecto al ADN nuclear) es la región de elección para muestras degradadas. Por su parte, el ADN cloroplástico (ADNcp) posee las mismas características que el ADNmt, siendo también su herencia de origen materno. Recordemos que la presencia de mitocondrias y los cloroplastos se explica en la actualidad por la teoría endosimbiótica seriada.

Así, los marcadores moleculares ofrecen según su ubicación en el genoma y su modo de herencia, distintos tipos de información para su aplicación en diversas problemáticas.

Algunas técnicas empleadas en el análisis de marcadores moleculares

El circuito que sigue una muestra para evidenciar su genotipo para un marcador específico tiene distintos pasos que diferirán en su complejidad de acuerdo a determinadas variables, como pueden ser el tipo de muestra de partida y el método utilizado para su genotipificación.

En la figura 5.1 se muestran los pasos a seguir para la determinación del genotipo de un organismo, enumerando algunas técnicas utilizadas para este fin.

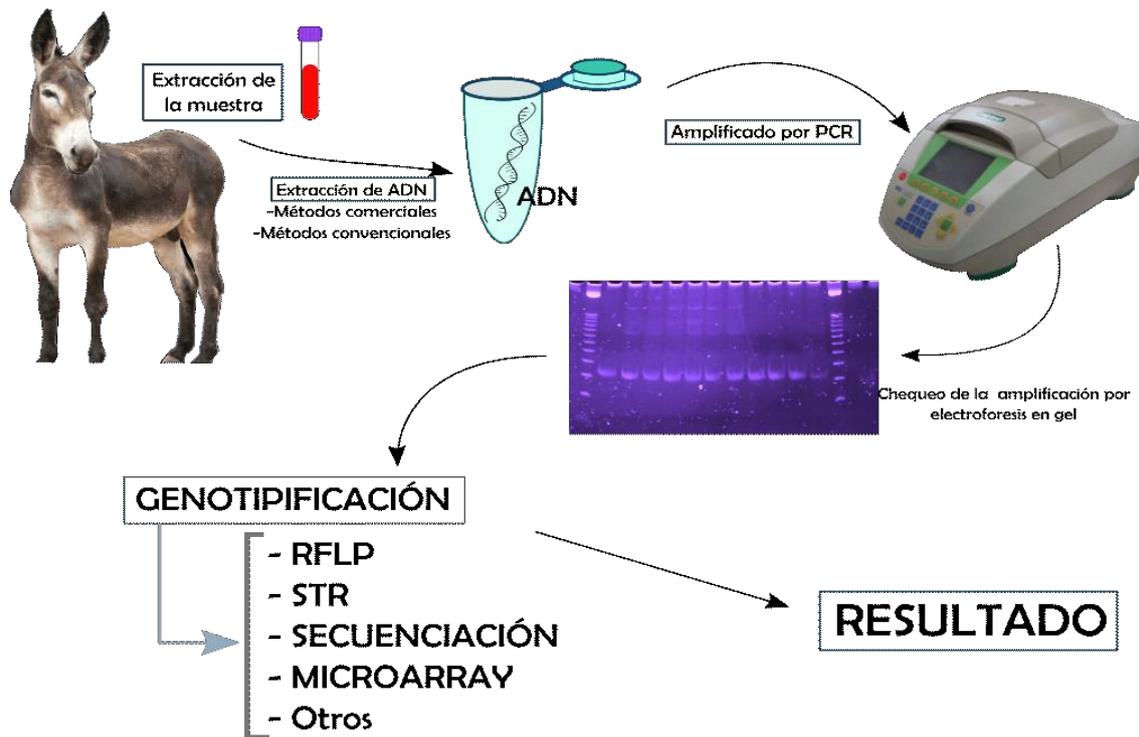


Figura 5.1. Circuito de la muestra en un laboratorio de genotipificación, desde su toma hasta la obtención del resultado según el análisis deseado y algunas de las metodologías que pueden ser empleadas.

El primer paso en estos análisis es la toma de muestra, y dependiendo de ello, será el método empleado para la conservación y la extracción del material genético. Recordemos que todas las células que componen un organismo cuentan con el mismo material hereditario; salvo contadas excepciones como son aquellas dadas por diferenciación y especialización como es el caso de los glóbulos rojos de los mamíferos. Una vez que se ha obtenido y aislado el ADN, se aumentará el número de copias del segmento que contiene al marcador genético y posteriormente se utilizará una técnica determinada que permita identificar el genotipo buscado.

En relación a la generación de numerosas copias del segmento informativo, dedicaremos un espacio a la técnica que permite su obtención. Así, la Reacción en Cadena de la Polimerasa o simplemente PCR (siglas provenientes del inglés *Polymerase Chain Reaction*) se constituyó como un aporte significativo en el desarrollo dentro del área molecular. En el año 1985, Kary Mullis desarrolló un método para multiplicar *in vitro* fragmentos definidos de ADN, a través de ciclos sucesivos de polimerización. Este método revolucionaría en corto tiempo el conjunto de técnicas de la biología molecular y su uso se extendió rápidamente tanto en la investigación básica como en el campo aplicado.

La técnica de amplificación de una región específica del genoma, se realiza con sucesivos cambios de temperatura, que involucran distintas etapas con el fin de lograr millones de copias de la región de interés. Al igual que en el proceso biológico de la replicación del ADN, esta reacción necesita de ciertos requisitos como:

- 1- **Molde:** La replicación del ADN es semiconservativa, por lo tanto es necesaria la presencia de una molécula molde sobre la que se sintetizarán las nuevas cadenas.
- 2- **Desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs):** Nucleótidos libres para poder realizar el proceso de polimerización. Las DNA polimerasas van a crear una cadena complementaria a la cadena molde mediante la incorporación de nucleótidos al extremo 3' libre del cebador. Los nucleótidos se añaden como dNTPs y deben estar disponibles los cuatro en igual concentración (desoxirribonucleósidos trifosfato de adenina, citosina, guanina y timina).
- 3- **Cebador:** Los cebadores, también conocidos como “iniciadores” o en inglés “*primers*”, son cadenas cortas de nucleótidos (oligonucleótidos) que se sintetizan artificialmente y que enmarcarán la zona de interés a replicar. En la PCR convencional, hay dos cebadores denominados directo (*forward*) e inverso (*reverse*), que hibridan permitiendo flanquear la zona que se desea amplificar. Así, cada cebador se asocia por complementariedad de bases con una de las cadenas de ADN y esto va a permitir que la amplificación comience a partir de cada cebador en dirección 5' - 3', multiplicándose exponencialmente durante los sucesivos ciclos de la PCR. Los cebadores brindan el extremo 3' OH libre necesario para comenzar con el proceso de polimerización, como ocurre en el proceso de replicación del ADN en la naturaleza. De este modo, se subraya la importancia del diseño de los mismos, ya que son los que le confieren la especificidad a la reacción.
- 4- **Enzima:** la ADN polimerasa es capaz de generar una copia de ADNc a partir del ADN molde. Esta enzima únicamente es capaz de añadir nucleótidos al extremo 3' OH libre aportado por el cebador y necesita un ADN molde que indique el ordenamiento en la incorporación de los nucleótidos sucesivos por complementariedad.
- 5- **Solución tampón (Buffer):** las enzimas para su acción necesitan un medio con el pH correcto, el que es proporcionado por la solución buffer. Las versiones comerciales de las polimerasas incluyen la solución tampón que requiere la enzima.

Una variable a tener en cuenta en las reacciones de amplificación por PCR, es la concentración del ion magnesio, ya que afecta varios sucesos de la reacción como son: el alineamiento de los cebadores, la temperatura de disociación de las cadenas y fundamentalmente la actividad y fidelidad de la enzima.

Habiendo enumerado los elementos necesarios para llevar adelante la PCR, analizaremos las distintas etapas que la componen. Como mencionamos anteriormente, los cambios que en la naturaleza ocurren por la intervención de varias enzimas durante la replicación del ADN, en esta reacción son reemplazados o equiparada su función por cambios de temperatura. Estos cambios se realizan con la finalidad de favorecer distintos procesos que se repiten cíclicamente y que se describen a continuación:

Desnaturalización: En esta etapa, la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ello se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (93-97°C) durante un corto tiempo, en general entre 2 a 5 minutos.

Hibridación: Durante la misma, los cebadores se unen a las zonas específicas que queremos amplificar. La asociación de la cadena molde con el cebador se facilita por el descenso de la temperatura que, en esta etapa, varía entre 50-65°C y puede estimarse teniendo en cuenta la Temperatura de Melting.

Extensión o Polimerización: Aquí se produce la síntesis de una cadena sencilla, complementaria a la cadena molde en la dirección 5'-3'. Esta reacción se produce por la acción de la enzima DNA polimerasa, la cual incorpora los desoxirribonucleótidos presentes en el medio siguiendo el orden marcado por la cadena molde.

A continuación, en la figura 5.2, se señalan los componentes y los pasos esenciales de la PCR:

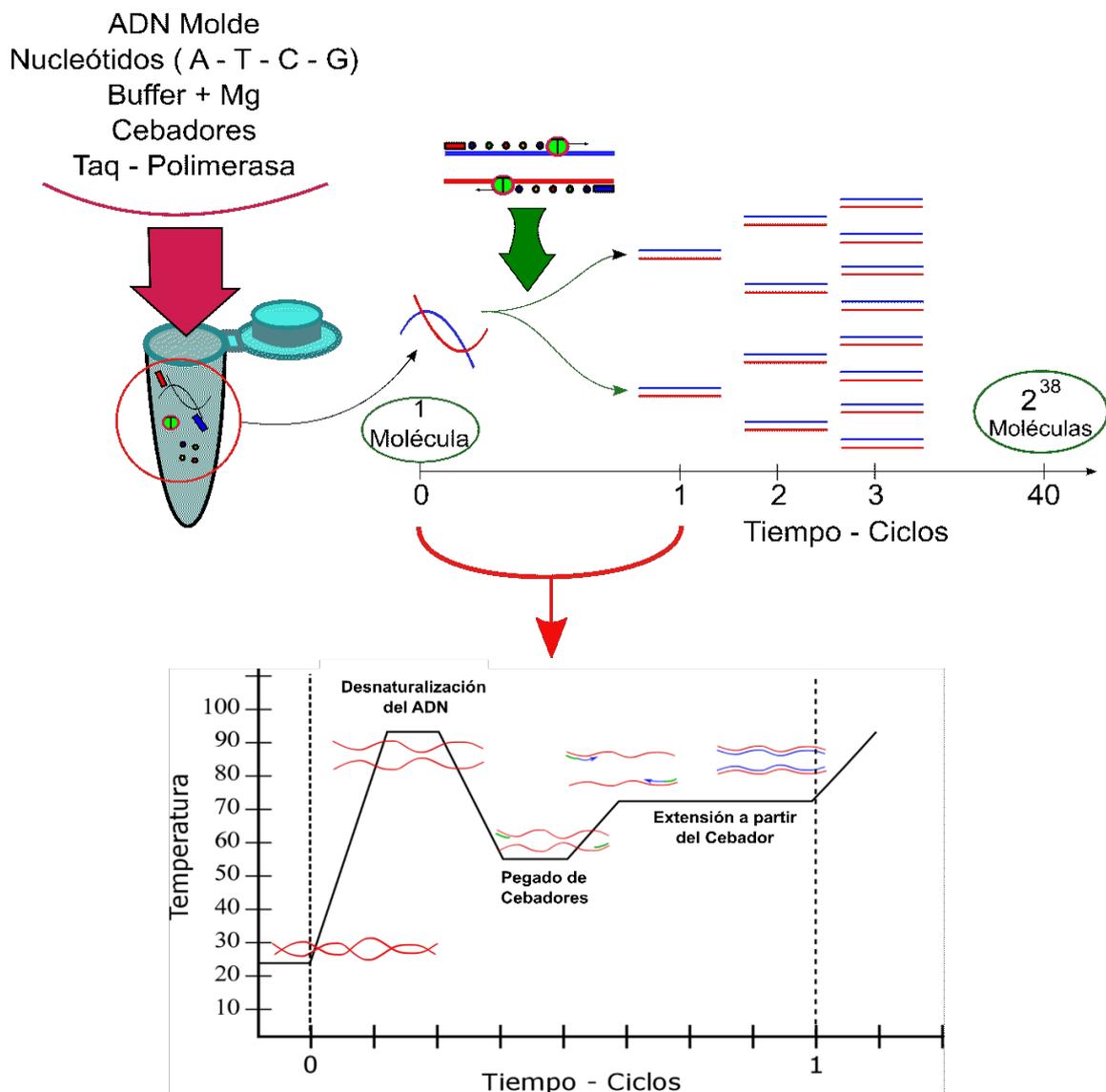


Figura 5.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Componentes necesarios para la reacción, proceso de duplicación del fragmento de interés y amplificación exponencial de la reacción.

La reacción en cadena de la polimerasa se realiza en un termociclador, un aparato que permite llevar a cabo de forma automatizada y reproducible la sucesión de ciclos de temperatura. Éste se compone de un bloque térmico, cuyo calentamiento y enfriamiento se produce a gran velocidad gracias al denominado sistema Peltier.

Algunas metodologías empleadas en la genotipificación de marcadores moleculares

Retomando el concepto de marcador genético y la importancia de poder evidenciar el polimorfismo presente en ellos, se han desarrollado numerosas técnicas que permiten llevarlo a cabo. Así, las variantes de la PCR son numerosas y van desde diferenciarse por modificaciones en la propia técnica, como también del tratamiento posterior del amplicón (producto de la reacción de amplificación) en función de evidenciar la variabilidad en el fragmento de ADN seleccionado. En este capítulo nos abocaremos a describir algunas de las que consideramos como las técnicas más utilizadas en el campo de la biología.

PCR seguida de Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PCR- RFLP)

Como lo mencionamos con anterioridad, esta técnica fue descrita por Alec Jeffreys y aplicada en la técnica de fingerprinting. El amplificado obtenido por PCR se somete a la digestión con una enzima de restricción específica. Estas enzimas cortan cuando reconocen secuencias específicas en el ADN amplificado, pudiendo generar fragmentos de distintas longitudes (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción = RFLP, del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*), donde cada patrón de corte se corresponderá con una variante alélica. Los distintos patrones de restricción se evidenciarán mediante electroforesis en geles, así en el caso más simple, en un organismo que no tiene el sitio donde corta la enzima se verá una única banda, mientras que en los sí tienen ese sitio, se verán dos bandas. Pueden presentarse también, más sitios de corte en una misma secuencia; los diferentes patrones obtenidos en función a ello, definirán las variantes alélicas del sistema analizado. Otros sistemas de mayor complejidad, están representados por el uso combinado de más de una enzima en la determinación de las variantes alélicas para un marcador.

Ejemplo de un caso sencillo, estaría dado por presencia/ausencia de un sitio de corte, lo que define dos alelos. Uno de ellos puede estar asociado a un carácter de interés, pudiendo utilizarse esta técnica en diferentes campos de aplicación. En la figura 5.3, se muestra el diferente patrón de corte en el exón 4 del gen Kapa Caseína (*CASK*) en bovinos, cuyas variantes se asocian a diferentes niveles de proteína en leche.

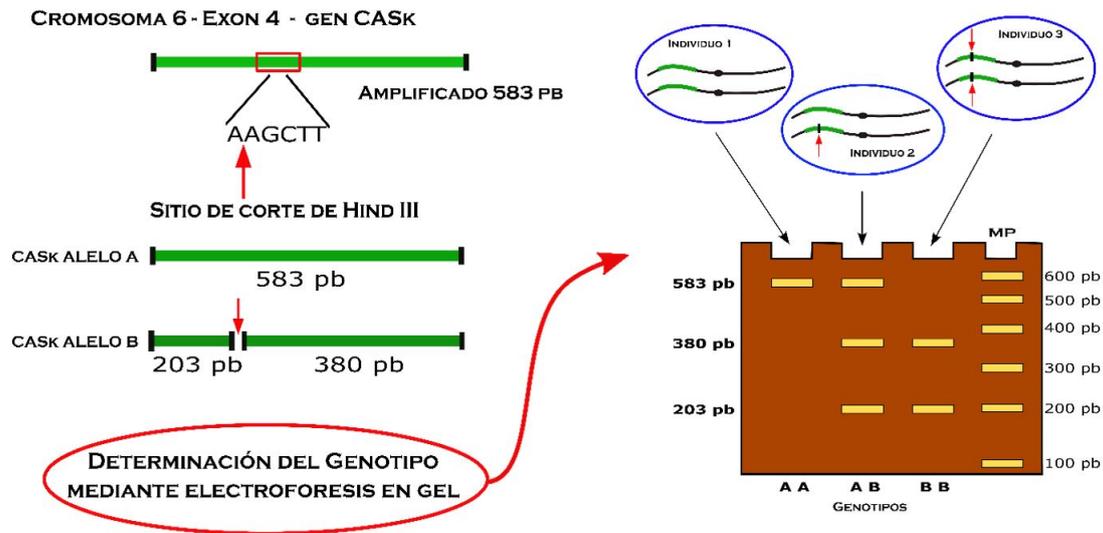


Figura 5.3. PCR- RFLP empleado para la diferenciación de variantes del gen Kapa Caseína por corte con enzima de restricción Hind III.

Secuenciación

Es una técnica que consiste en la determinación de la secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN. El método de secuenciación por terminación de cadena o dideoxi ideado por Sanger está basado en el empleo de dideoxynucleótidos, que son nucleótidos que carecen del grupo hidroxilo 3' de la pentosa, de manera que cuando uno de estos nucleótidos se incorpora a la cadena de ADN en crecimiento, la misma no puede continuar elongándose ya que la ADN polimerasa necesita ese hidroxilo para añadir el siguiente nucleótido.

Cada dideoxynucleótido está marcado con un fluorocromo de diferente color, así cuando los fragmentos estudiado se someten a un campo electroforético, cada posición estará representada por el color específico de su fluorocromo. Los equipos utilizados en la actualidad, realizan la corrida electroforética en capilares, en donde en un sector incidirá un láser que excitará los fluorocromos de los dideoxynucleótidos y la luz emitida por estos será captada por un detector, que mediante un programa específico determinara la base asociada a esa posición. Esto permitirá conocer la sucesión de nucleótidos en los fragmentos analizados, visualizado en un gráfico denominado electroferograma, donde cada pico de emisión de fluorescencia representa un nucleótido específico. Los pasos del proceso de secuenciación, se muestran en la figura 5.4.

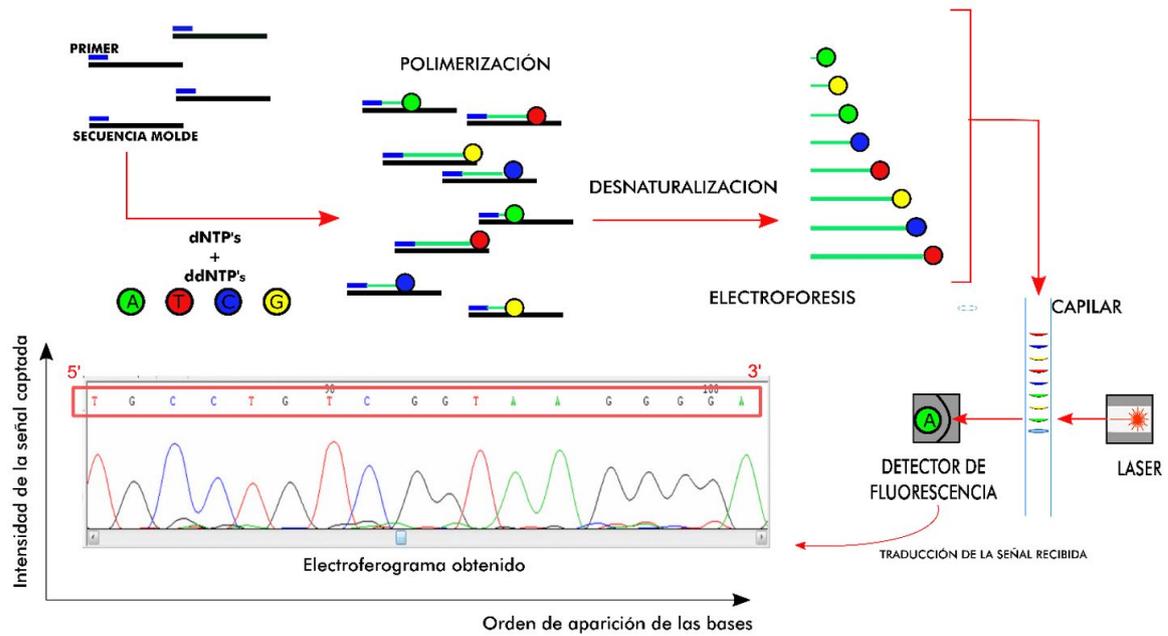


Figura 5.4. Secuenciación. Determinación de la secuencia de nucleótidos basada en la técnica de Sanger, utilizando un secuenciador automático capilar.

Detección de secuencias repetitivas: micro y minisatélites

Las secuencias micro y minisatélites forman parte del ADN no codificante, aquel que no está relacionado con las secuencias de los distintos ARN o proteínas y se hallan conformadas por repeticiones en tándem de determinadas secuencias de nucleótidos. En el caso de los microsatélites estas secuencias repetidas están formadas por un *core* (núcleo o motivo de repetición) que puede tener, en la mayoría de los casos, entre 2 a 5 nucleótidos; mientras que en el caso de los minisatélites estas repeticiones están conformadas por entre 20 a 24 nucleótidos.

La detección de los mismos involucra la amplificación de cada marcador microsatélite o minisatélite y la posterior diferenciación de las variantes de cada sistema, mediante electroforesis. Esta electroforesis al igual que en el caso de la secuenciación, se realiza por tecnología automatizada de electroforesis capilar. La diferencia entre las variantes alélicas de cada marcador está dada por el número de repeticiones del *core*, por ejemplo una variante podría definirse por cinco repeticiones sucesivas de la secuencia *core*, mientras que otro alelo podrá estar conformado por siete repeticiones. El número de repeticiones definirá el largo del fragmento amplificado, determinando su posición en la corrida electroforética (Figura 5.5 y 5.6).

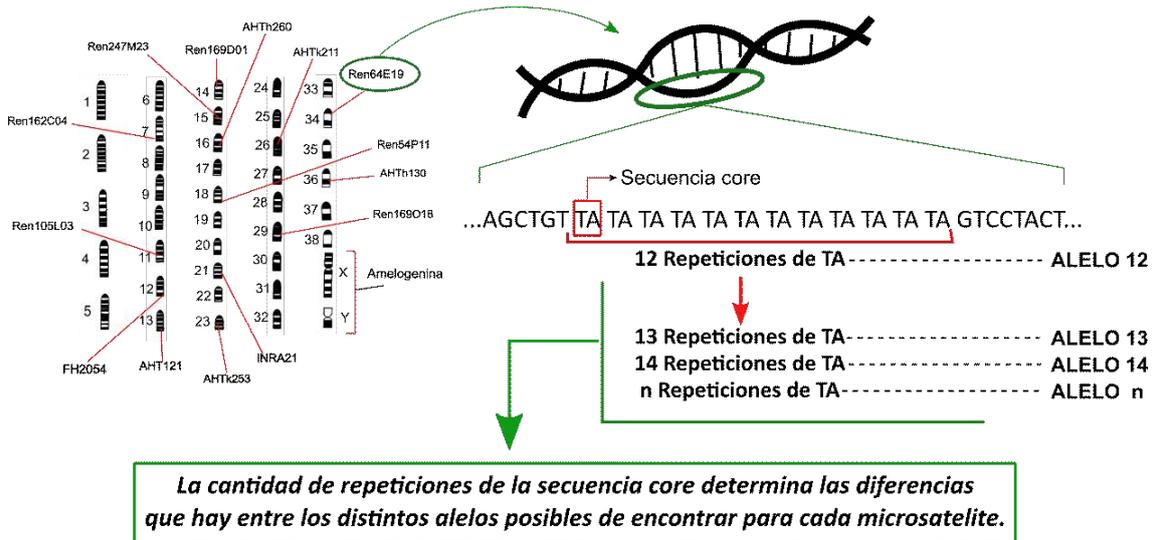


Figura 5.5. Microsatélites (STRs), ejemplo de ubicación en el genoma del perro y posibles variantes alélicas de un mismo marcador obtenidas por electroforesis capilar.

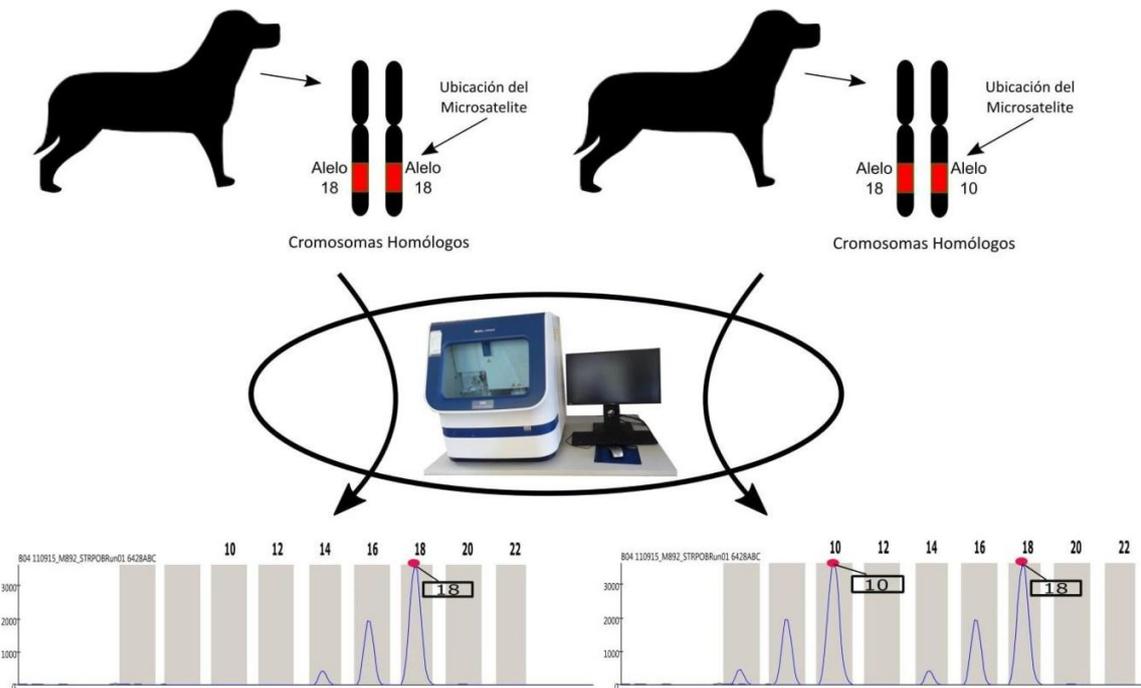


Figura 5.6. Interpretación de los resultados del análisis de un marcador microsatelite a través de electroforesis capilar, mostrando un electroferograma de un individuo homocigota y otro heterocigota.

La determinación de cada variante alélica se encuentra estandarizada de acuerdo a parámetros internacionales en las especies más estudiadas, posibilitando la comparación de resultados a nivel mundial. Estos marcadores tienen una amplia gama de aplicaciones, desde la identificación individual, estudios de filiación, caracterización de poblaciones y parámetros de diversidad, entre otros.

Detección de Polimorfismo de nucleótido simple (SNPs- Single Nucleotide Polymorphism)

Otra de las diferencias que se presentan en el genoma de los organismos está dada por el cambio de un nucleótido por otro (transición o transversión), en una posición determinada del ADN. Así, cada variante alélica de un SNPs está definida por la presencia de un nucleótido dado en una posición específica; dicha posición podrá estar ocupada por un nucleótido alternativo. Cada nucleótido alternativo en dicha posición, será definido como variante alélica. Los SNPs conforman la variación genética más común, con más de ciento cincuenta millones reportados en las bases de datos públicas.

Para evidenciar las diferencias dadas por la presencia de un nucleótido en una posición específica, existen numerosas técnicas como por ejemplo el RFLP, la secuenciación, la pirosecuenciación, la minisequenciación, etc. En la figura 5.7 se muestra la detección de variantes alélicas utilizando la secuenciación como método para evidenciarlas.

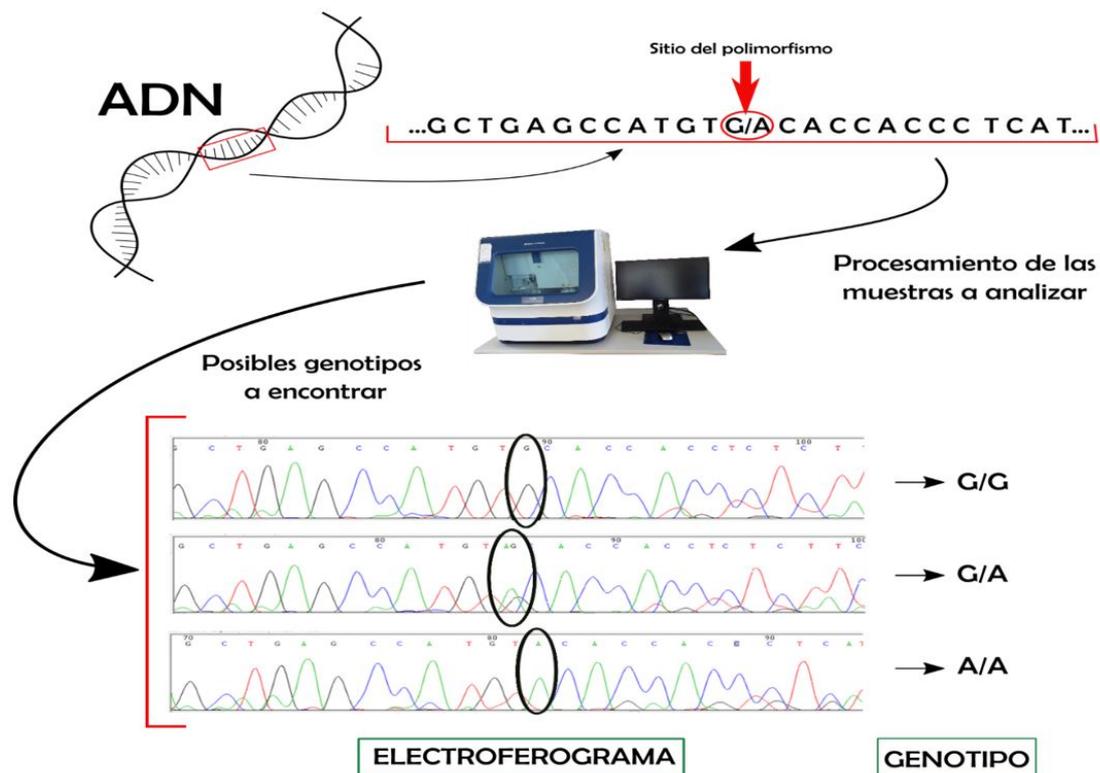


Figura 5.7. Polimorfismo de nucleótido simple (SNP). Determinación de un SNPs a través de la secuenciación de un fragmento de interés e interpretación de los posibles genotipos.

Para citar un ejemplo muy estudiado, en el caso de los humanos los SNPs forman el 90% de todas las variaciones genómicas, apareciendo aproximadamente uno cada 300 bases a lo largo del genoma. Dado que solo un pequeño porcentaje del genoma son secuencias relacionadas con la producción de proteínas, la mayoría de los SNPs se hallan fuera de las zonas codificantes. Sin embargo, los SNPs que se encuentran dentro de las regiones codificantes revisten gran importancia ya que, probablemente, pueden alterar la función biológica de las proteínas.

Una tecnología que merece una mención especial, que permite la detección de SNPs en forma masiva es la tecnología de microchip o *microarray* de ADN, que consiste en la detección de variantes alélicas por hibridación del ADN genómico de la muestra a analizar con una serie de sondas fijadas en un soporte sólido. El ADN genómico debe amplificarse y fragmentarse enzimáticamente para facilitar el proceso de hibridación. Cada una de estas sondas permite detectar SNPs informativos o diagnósticos. Las sondas están diseñadas de forma tal que llegan hasta el nucleótido anterior al sitio en donde está el SNP. Posteriormente a hibridar con el fragmento del ADN genómico se adiciona enzimáticamente una base tomando a éste último como molde. Cada base incorporada, estará identificada con un fluorocromo diferente permitiendo de este modo su reconocimiento. Así habrá una señal con uno de los fluorocromos, con el otro o con ambos en correspondencia a los genotipos de los individuos homocigotos para una variante, homocigotos para la otra variante o heterocigota respectivamente.

Como ya mencionamos, las sondas con las que hibridarán las muestras de ADN se hallan fijadas a una superficie sólida por un extremo. Esta superficie se divide en celdas, en cada una de ellas habrá sondas idénticas que mediante hibridación y posterior emisión de señal lumínica, nos permitirán determinar la variante alélica del sitio informativo a analizar en esa posición. La determinación de las variantes alélicas se realiza simultáneamente a través de la utilización de un equipo y de programas de análisis específicos. La cantidad de celdas define la densidad del microchip, yendo desde miles hasta cientos de miles, clasificándose así en *microarrays* de baja o alta densidad. En la figura 5.7 se muestra la tecnología de microchips o microarray, mostrando los diferentes pasos involucrados.

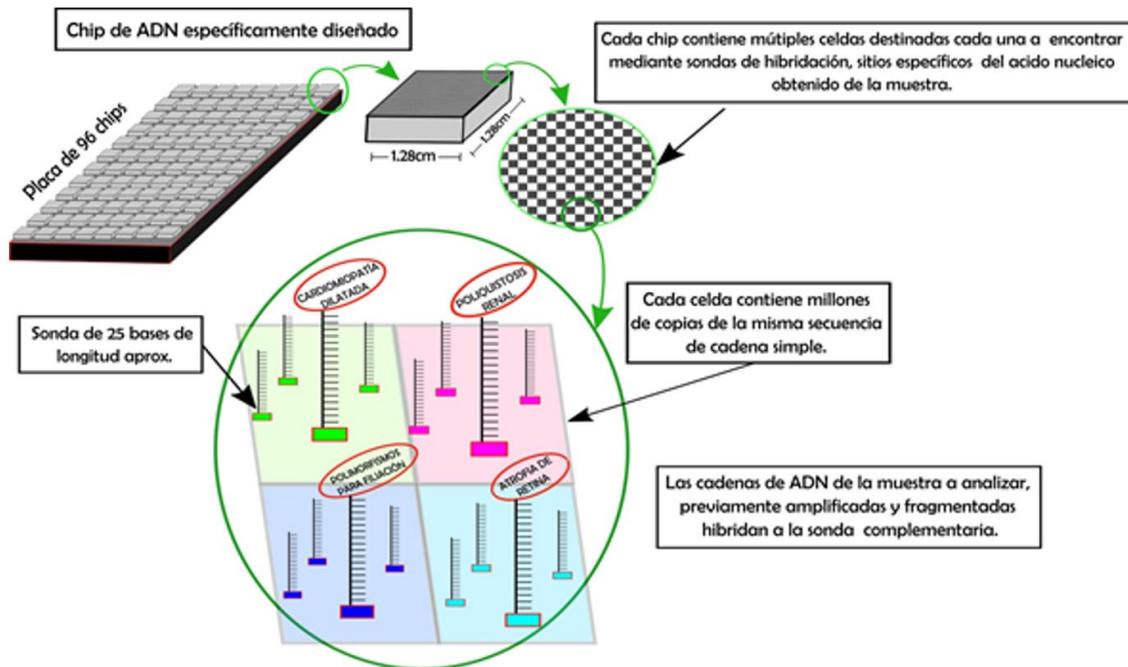


Figura 5.8. Tecnología de Microarrays. Cada chip es diseñado específicamente para detectar miles de sitios polimórficos de forma simultánea.

Esta tecnología, a diferencia de las técnicas antes descritas, permite la obtención de una muy alta cantidad de información, sobre sitios de SNPs. Si bien es una herramienta que se conoce hace muchos años, su empleo en las distintas áreas de biología se ha comenzado a utilizar recientemente.

Marcadores moleculares: algunas aplicaciones

Teniendo en cuenta las distintas herramientas tecnológicas, los tipos de marcadores moleculares, sus diferentes modos de herencia y su ubicación en el genoma, la aplicación de los mismos es muy amplia. De este modo se han constituido en elementos invaluable, que se utilizan cada vez más en diferentes disciplinas, auxiliando en el diagnóstico de enfermedades, la determinación de nuevas especies, el establecimiento de relaciones filogenéticas, el análisis de diversidad genética o el campo forense para nombrar solo algunas de ellas.

Los marcadores genéticos son ampliamente utilizados a la hora de relacionar las enfermedades heredables con su causa genética. Por ejemplo, en el caso en que una mutación en un determinado gen que altera la expresión o la función de éste, contribuyendo directamente a la manifestación de una enfermedad. En otros casos, un marcador ubicado en una secuencia próxima a un gen y el gen relacionado con una enfermedad pueden heredarse juntos por ligamiento génico; éste marcador puede servir para identificar a este gen a pesar de no estar implicado directamente en la expresión del gen. Esto muchas veces permite conocer el patrón de herencia conociendo los polimorfismos del marcador incluso cuando no conozcamos la localización precisa de ese gen. En este caso se dice que la variante alélica del marcador está asociada a la enfermedad. Aquellos marcadores que determinan una alta probabilidad de que se produzca una enfermedad son útiles como herramientas de diagnóstico.

La estabilidad del genoma hace que el genotipo para cualquier marcador se mantenga a lo largo de la vida del organismo. Este hecho define a una huella genética, que al igual que la huella dactilar, es única y las técnicas que hemos analizado con anterioridad, permiten evidenciarlas fácilmente. Esto permite la identificación individual en cualquier momento de su ciclo de vida, inclusive a partir de sus rastros biológicos.

En el caso de determinar el perfil genético de un individuo, los marcadores más utilizados son los microsatélites con ubicación nuclear. La tecnología de electroforesis capilar y la utilización de cebadores marcados con distintos fluorocromos, permiten establecer el genotipo de numerosos marcadores de este tipo en forma simultánea. Recordemos que los microsatélites son altamente polimórficos, presentando en general más de seis variantes alélicas por marcador. La combinación de los distintos genotipos para los diferentes marcadores, genera un perfil individual altamente específico. Esta característica es utilizada también para casos de filiación, donde cada progenitor biológico proporciona una de las dos variantes alélicas presentes en su descendencia, para cada marcador. El análisis de filiación, es utilizado también para mantener la fidelidad de los libros genealógicos, fundamen-

tales para realizar un seguimiento de los linajes, aplicar programas de selección y de mejora según la especie. Este tipo de estudio está acompañado de un soporte estadístico que permite indicar la confiabilidad del análisis realizado.

Los marcadores moleculares constituyen herramientas indispensables para determinar la variación genética y la biodiversidad con un alto grado de precisión y reproducibilidad. Por ejemplo a la hora de realizar el manejo de especies amenazadas en donde hay un evidente empobrecimiento genético suele ser necesario conocer la variabilidad poblacional, de forma de evitar la endogamia y una mayor pérdida de variación genética. La elección de los marcadores a utilizar esta en función a los objetivos, al tipo de información que se busca y de las facilidades disponibles.

Las aplicaciones de las técnicas de ADN en antropología permiten el análisis de patrones de variabilidad tanto en humanos como en organismos no humanos para poner a prueba hipótesis sobre el origen del hombre y su comportamiento ancestral. El uso de marcadores de ADN permite por ejemplo la reconstrucción de las relaciones de parentesco de los individuos hallados en un sitio arqueológico, de las interacciones con otras poblaciones, el estatus social o los patrones diferenciales de enfermedad o mortalidad por sexo o edad. También se pueden analizar restos no humanos que pueden brindar información como la diversidad de especies, revelando los patrones de obtención de alimentos, trazar la domesticación de las especies o aportar datos sobre enfermedades ancestrales. En base a los restos no humanos es posible reconstruir los ambientes e inferir el movimiento humano y de especies comensales así como los movimientos estacionales.

Muchas veces es preciso determinar el origen de un material biológico que por su procesamiento o por ser solo una parte del mismo hacen imposible su identificación por su morfología u otros métodos tradicionales. Estos pueden ser partes de animales (fragmentos de cuerno de rinoceronte, marfil, huesos de tigre, etc.) o plantas (semillas o compuestos extraídos de plantas exóticas como aceites y resinas). Es común que estos análisis están asociados al tráfico de especies silvestres con el fin de identificar la especie a la que pertenecen o determinar su origen geográfico. Estos materiales biológicos también pueden ser alimentos en los que se quiere determinar con qué especie de animal o vegetal están elaborados así como conocer el origen biológico de algún producto farmacéutico que podría estar producido a partir de especies no permitidas para su uso en humanos o que podrían generar reacciones adversas para la salud.

En casos donde el objetivo sea la determinación de la especie, se suelen utilizar genes que presentan escasa variabilidad dentro de la especie y alta variabilidad genética entre especies.

Una aplicación de los marcadores genéticos está asociada a la sistemática de especies presentes en nuestro planeta. Por ejemplo, los “Código de barra de la vida” incluyen a varios proyectos internacionales (*Barcode of Life* -BOLD, *Consortium for the Barcode of Life* -CBOL) que tienen por finalidad identificar las especies y otros taxa con secuencias únicas de ADN y consisten en crear una colección pública de secuencias de referencia obtenidas de los “ejemplares tipo” de todas las especies de seres vivos. Las secuencias corresponden a una región estandarizada y corta de ciertos genes que tienen variabilidad entre los taxa. Para animales

este locus corresponde a un fragmento de aproximadamente 650 pb del extremo 5' del gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (*COI*). Para el resto de los organismos se usan uno o más genes. Por ejemplo, para los hongos el espaciador transcrito interno del rRNA (*Internal transcribed spacer rRNA –ITS*), para las plantas los genes cloroplásticos ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (*RuBisCO*) y maturasa K (*matK*) y para las bacterias el rRNA 16S. Así, los códigos de barras genéticos tienen un sin número de utilidades entre las que podemos nombrar la de identificar nuevas especies, asociar estados larvales con adultos de una misma especie, diferenciar especies crípticas, detectar especies invasoras como también colaborar en el manejo de especies amenazadas, en la protección ambiental o suministrar información de uso en biología evolutiva o estudios de la biodiversidad.

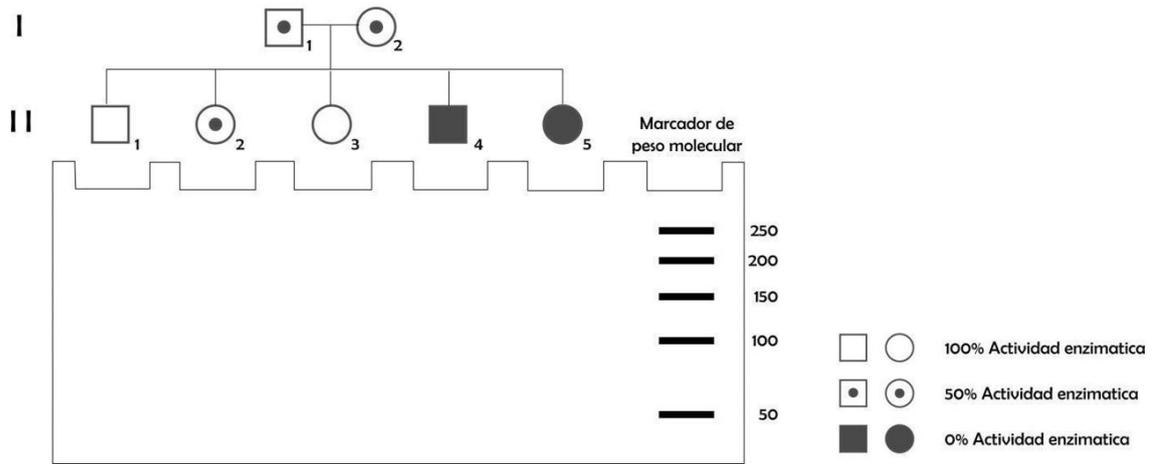
Cada vez se hace más común que en nuestra vida diaria incorporemos el uso de términos como gen, ADN, diversidad genética, genoma, marcadores moleculares, prueba del ADN y otros; dada la importante aplicación que tienen en la actualidad en diversas áreas (medicina, botánica, conservación, agricultura, etc.), estos términos se pueden ya leer o escuchar a diario, fuera del ámbito científico.

Ejercicios

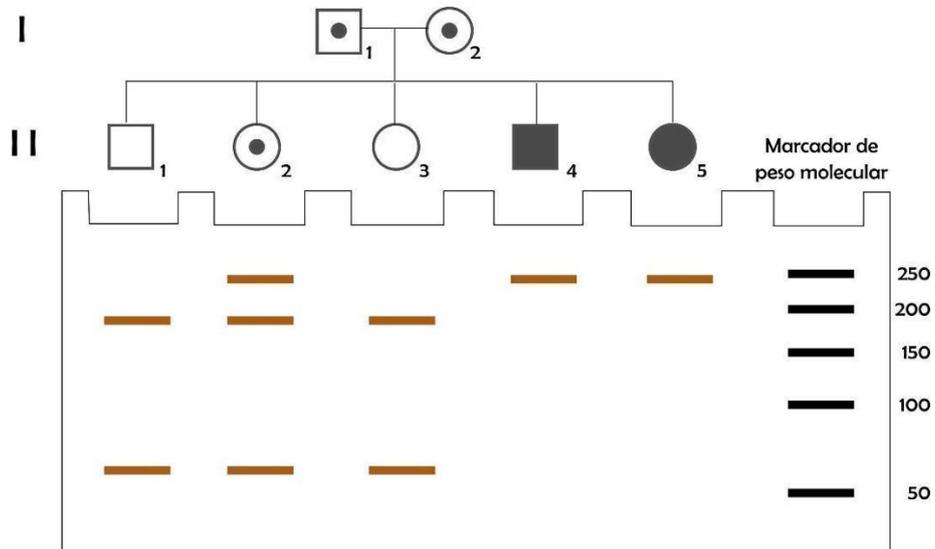
1- Una enfermedad hereditaria congénita propia de algunas caninas, se caracteriza por presentar variaciones en la actividad de una enzima (A) de los glóbulos rojos, afectando la vida media de estos. La mutación que produce la enzima defectuosa se debe a un cambio puntual en la posición 324 del segundo exón donde cambia una C por T. Este cambio permite el diagnóstico molecular a través de la técnica de PCR-RFLP. Con la enzima de restricción *Crspl* podemos diferenciar el alelo normal (C) del gen, el que presenta el sitio de reconocimiento y con su acción se generan dos fragmentos, uno de 40 pb y otro de 140 pb. Sin embargo cuando está presente el alelo mutado (T) no se presenta el sitio de reconocimiento de la enzima, quedando el fragmento amplificado con el tamaño original de 180 pb. Las mediciones de la actividad enzimática de cada genotipo es la siguiente:

- a) Los animales **T/T**, no presentaban actividad enzimática.
- b) Los animales **C/T**, presentaban el 50% de la actividad enzimática.
- c) Los animales **C/C** presentaban el 100 % de la actividad enzimática.

Teniendo en cuenta el siguiente pedigrí, realice el esquema de los patrones electroforéticos de los individuos de la segunda generación.



Resolución:



2- Para resolver un litigio sobre la paternidad de un potrillo, llegan al laboratorio Forense de la Facultad de Veterinaria-UNLP, cuatro muestras de sangre. Las mismas pertenecen al potrillo en cuestión, la yegua madre (de la que se tiene certeza sobre su vínculo biológico) y dos padrillos para los que debe resolverse cuál es el progenitor biológico del potrillo. Con el fin de poder resolver este caso, se extrae el ADN de cada muestra, se amplifican los marcadores tipo microsatélites y se realiza el análisis pertinente. De este modo, se determinó que uno de los padrillos era el progenitor biológico del potrillo (Padrillo 1), mientras que el restante quedaba excluido como tal (Padrillo 2).

En la siguiente tabla se muestran los animales en cuestión y los microsatélites utilizados. Complete los genotipos de cada animal para cada marcador de tal manera que sea coincidente con el resultado antes mencionado.

	Microsatélite							
Animal	HMS2	HMS3	ASB2	HTG6	HTG7	LEX52	TKY333	AHTG4
Padrillo 1	A-A							
Padrillo 2								
Yegua				K-N				
Potrillo	A-D			K-N				

Resolución: El genotipo del potrillo está conformado, para cada microsatélite, por dos alelos cada uno proveniente de cada uno de los progenitores. Al ser la maternidad segura, el alelo que aporta la madre no es cuestionado, por lo tanto se completará el genotipo para cada marcador teniendo en cuenta que uno deberá coincidir con uno de los dos alelos presentes en el genotipo de la madre (alelo obligado). El alelo restante del potrillo provendrá del padre biológico, en este caso particular deberá estar presente en el padrillo 1. En el caso que el alelo no materno de la cría, no pueda explicarse por su presencia en el padrillo, hará que ese animal quede excluido como progenitor biológico de esa cría. Teniendo en cuenta eventos de mutación, la exclusión se dará cuando se presente discordancia (*mismatch*) en 2 o más marcadores, caso en el cual el padrillo quedará excluido como padre biológico de esa cría.

	Microsatélite							
Animal	HMS2	HMS3	ASB2	HTG6	HTG7	LEX52	TKY333	AHTG4
Padrillo 1	A-A	K-L	O-O	K-K	R-T	G-H	I-I	M-N
Padrillo 2	B-B	L-M	R-S	K-L	S-S	H-J	I-J	N-O
Yegua	D-E	L-L	P-R	K-N	R-R	I-K	I-J	M-M
Potrillo	A-D	L-L	O-P	K-N	R-R	G-I	I-I	M-N

3- A continuación se presenta el alineamiento de las secuencias del Citocromo b (*Cytb*) ubicado en el ADN mitocondrial de tres especies de mamíferos. Con el fin de poder diferenciar qué muestras provienen de cada especie, se utilizan sitios polimórficos puntuales a lo largo de la secuencia que define a cada especie (haplotipo). Determine en estos tres ejemplos cuáles son estos sitios informativos.

```

ciervo      CATGAGGACAAATATCATTTCTGAGGAGCAACAGTCATTACCAACCTTCTCTCAGCAATTC 60
búfalo     CATGAGGACAAATATCATTTCTGAGGGGCAACAGTCATCACCAACCTTCTCTCAGCAATCC 60
vaca       CATGAGGACAAATATCATTTCTGAGGAGCAACAGTCATCACCAACCTTCTATCAGCAATCC 60

ciervo     CATATATTGGTACAAACCTAGTCTGAATGGATCTGAGGGGGCTTTTCAGTAGACAAAGCAA 120
búfalo     CATAATTGGTACAAGTCTGGTTGAATGAATTTGAGGGGGATTCTCAGTAGACAAAGCAA 120
vaca       CATAATCGGCACAAATTTAGTCTGAATGAATCTGAGGCGGATTCTCAGTAGACAAAGCAA 120

```

ciervo	CCCTAACCCGATTTTTTCGCTTTCCACTTTATTCTCCCATTTATCATCGCAGCACTCGCTA	180
búfalo	CCCTCACCCGATTCTTCGCATTTCACTTCATCCTCCCATTATTATCGCAGCACTTGCAA	180
vaca	CCCTTACCCGATTCTTCGCTTTCCATTTTATCCTTCCATTTATCATCATAGCAATTGCCA	180
ciervo	TAGTACACTTACTCTTCTCCTTCACGAAACAGGATCTAACAAACCCACAGGAATTCCATCAG	240
búfalo	TAGTCCACCTATTATTCTCCACGAAACAGGATCCAACAACCCACAGGAATTCCATCAG	240
vaca	TAGTCCACCTACTATTCTCCACGAAACAGGCTCCAACAACCCACAGGAATTCCCTCAG	240

Resolución: Se resaltan en color los sitios que presentan diferencias entre las especies analizadas. La combinación de todos estos sitios polimórficos para cada especie conforma el haplotipo propio de ésta.

ciervo	CATGAGGACAAATATCATTCTGAGGAGCAACAGTCATACCAACCTCTCTCAGCAATTC	60
búfalo	CATGAGGACAAATATCATTCTGAGGGCAACAGTCATACCAACCTCTCTCAGCAATTC	60
vaca	CATGAGGACAAATATCATTCTGAGGAGCAACAGTCATACCAACCTCTTATCAGCAATTC	60
ciervo	CATATATTGGTACAAACCTAGTGAATGATCTGAGGGGGTTTTCAGTAGACAAAGCAA	120
búfalo	CATACATTGGTACAAAGTCTCGTGAATGATTTGAGGGGGATTCTCAGTAGACAAAGCAA	120
vaca	CATACATCGGCACAAATTTAGTGAATGATCTGAGGCGGATTCTCAGTAGACAAAGCAA	120
ciervo	CCCTAACCCGATTTTCGCTTTCCACTTTATTCTCCCATTTATCATCGCAGCACTCGCTA	180
búfalo	CCCTCACCCGATTCTTCGCATTTCACTTCATCCTCCCATTATTATCGCAGCACTTGCAA	180
vaca	CCCTTACCCGATTTTCGCTTTCCATTTTATCCTTCCATTTATCATCATAGCAATTGCCA	180
ciervo	TAGTACACTTACTCTTCTCCTTCACGAAACAGGATCTAACAAACCCACAGGAATTCCATCAG	240
búfalo	TAGTCCACCTATTATTCTCCACGAAACAGGATCCAACAACCCACAGGAATTCCATCAG	240
vaca	TAGTCCACCTACTATTCTCCACGAAACAGGCTCCAACAACCCACAGGAATTCCCTCAG	240

Referencias

- Arif, I. A. & Khan, H. A. (2009). Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation*, (32.1), 9–17.
- Cavalli-Sforza L. L. & Bodmer, W. F. (1965). *Genética de las poblaciones humanas*. Editorial Omega. 1981. Barcelona. Ford EB: *Polymorphism. Biology Reviews*, (20), 73 - 88.
- Giovambattista, G. & P. Peral Garcia. (2010). *Genética de Animales Domésticos*. Buenos Aires. Editorial Intermédicas.
- Kaestle F. & Horsburgh K. A. (2002). Ancient DNA in Anthropology: Methods, Applications, and Ethics. *Yearbook of Physical Anthropology*, (45), 92–130.
- Landsteiner, K. (1901). Ueber heterogentisches antigen und haptén. *Biochem. Z.*, (119), 294-306.
- Lucotte, G. (1977). *Le polymorphisme biochimique et les facteurs de son maintien*. Editorial Masson, Paris.
- Rocha, D., Gut, I., Jeffreys, A., Kwok, P., Brookes, A. & Chanock, S. (2006). Seventh international meeting on single nucleotide polymorphism and complex genome analysis: 'ever bigger scans and an increasingly variable genome'. *Hum Genetic*. (119-4), 451-456.
- Telenti, A., Pierce, L., Biggs, W., et al. (2016). Deep sequencing of 10,000 human genomes. *PNAS*, (42). 11901-11906.

CAPÍTULO 6

Genética de poblaciones

Melisa Mantella y Diana M. Hohl

La selección natural no trabaja como un ingeniero, sino como un chapucero, un chapucero que todavía no sabe qué va a producir, pero recupera todo lo que le cae sobre sus manos, los objetos más heterogéneos, ... un chapucero que aprovecha todo lo que encuentra a su alrededor para obtener algún objeto que sea útil.

François Jacob, EVOLUTION AND TINKERING

Para comenzar a hablar sobre genética de poblaciones es preciso definir el objeto de estudio. Se considera como población a un grupo de individuos que pertenecen a una misma especie y dentro de la cual ocurren potencial o realmente apareamientos al azar. En casi todas las especies encontramos que las poblaciones se cruzan entre sí, intercambiando el material genético. Así, comparten el mismo acervo génico. La llamaremos Población mendeliana, la cual es la unidad de estudio de la genética de poblaciones

Las poblaciones no son estáticas, sino que sufren diversos cambios en su historia que se manifestarán como nacimientos, muertes, migraciones y demás, que con el tiempo producirán cambios en la estructura genética de las mismas.

Las diferencias en la composición genética entre individuos de una misma población pueden acumularse a lo largo del tiempo, produciendo así lo que llamamos evolución biológica. Por lo tanto, los individuos se definen y describen a partir de sus genotipos y fenotipos, y para la Genética de Poblaciones, el foco se centra en la cuantificación de las frecuencias alélicas y genotípicas de una población.

Frecuencias alélicas y genotípicas

La estimación de las frecuencias alélicas y genotípicas de una población, permitirán conocer su constitución genética, saber si han sufrido o sufren procesos evolutivos, permitiendo así la comparación con otras poblaciones de la misma especie o especies distintas. El término *alelo*, se refiere a las diferentes formas o variantes en las cuales puede presentarse un gen y la proporción en la que cada variante se encuentra en una población se denomina *frecuencia alélica*.

Esta frecuencia puede variar entre poblaciones, y la diferencia puede ser mayor, en general, mientras mayor sea la distancia que las separa. La distribución geográfica de un alelo en particular puede dar información sobre el lugar donde se originó el mismo y como se fue dispersando. Un ejemplo de ello, puede darlo el color de los ojos en el humano, donde se ha descrito que un alelo determinado del gen *HERC2*, es uno de los principales responsables del color de iris azul en nuestra especie. Debido a la alta frecuencia de individuos con ojos azules en Europa, se ha rastreado el origen de esta variante hasta el Este/Noroeste del Mar Negro. A su vez, la correlación de las frecuencias alélicas con ciertos factores ambientales ha llevado al descubrimiento de ciertas adaptaciones genéticas, como veremos más adelante.

Cada gen presenta dos variantes por individuo diploide y son las que conforman el **genotipo** del individuo, como ha sido tratado en el capítulo 1 de este libro. En genética de poblaciones, en general, nos referimos al genotipo de un gen en particular. Así, en un organismo diploide, un alelo es heredado vía materna y el otro por vía paterna. La proporción en la que se encuentra cada genotipo en una población se denomina **frecuencia genotípica**.

Ley de Hardy-Weinberg

Hacia el año 1908, Godfrey Harold Hardy y Wilhelm Weinberg describieron una ley o modelo matemático teórico donde relacionaron las frecuencias alélicas y genotípicas en una población mendeliana. Este modelo, para su consideración implica un conjunto de supuestos, a saber:

- La población tenderá a ser infinitamente grande
- La población deberá ser panmíctica, es decir que los apareamientos ocurrirán al azar
- Cada uno de los genotipos de la población son igualmente viables y fecundos
- No operan fuerzas microevolutivas (Selección Natural, Mutación, Migración ni Deriva)

Bajo estos supuestos las frecuencias alélicas y genotípicas se mantienen constantes de una generación a la siguiente, circunstancia que considera que **la población se mantiene en equilibrio**.

Cabe destacar que esta ley es válida para poblaciones dioicas, con reproducción sexual, con generaciones no superpuestas y sexos presentados en número equitativo. Además, dentro del supuesto de apareamiento al azar, se incluye la ausencia de endogamia, ya que la misma indica el cruzamiento entre individuos emparentados, que lleva a un aumento de la frecuencia de homocigotas y a una pérdida consiguiente de variabilidad, disminuyendo las posibilidades de adaptación de la especie.

En loci autosómicos

El equilibrio se alcanza tras una generación de apareamientos al azar. Respecto a las frecuencias genotípicas, si quisiéramos calcular la frecuencia con la que cada genotipo se presen-

ta en la población deberá relacionarse cada genotipo particular, con el número total de individuos de dicha población.

$$FG = \frac{\text{número de individuos con determinado genotipo}}{\text{total de individuos de la población}}$$

Por lo tanto, para un locus con 2 alelos

$$f(\mathbf{AA}) = n_{AA} / N \quad f(\mathbf{Aa}) = n_{Aa} / N \quad f(\mathbf{aa}) = n_{aa} / N$$

Cuando hablamos de frecuencias, el total de la suma de las frecuencias de todos los genotipos presentes deben sumar 1: $f(\mathbf{AA})+f(\mathbf{Aa})+f(\mathbf{aa})=1$.

Para el caso de alelos codominantes o con dominancia incompleta, los individuos con cada uno de los fenotipos coinciden con cada uno de los genotipos. Diferente es el caso en que la característica presente dominancia completa sobre el otro, así no se podrán distinguir desde el fenotipo dominante, si son homocigotas o heterocigotas para tal carácter.

Respecto a las frecuencias alélicas, para estimarlas a nivel poblacional, se analiza si esta característica es polimórfica, o sea si presenta variantes en esa población específica, para así poder determinar la proporción de cada alelo en un locus dado y en una población específica. Para ello tendremos 2 caminos: utilizar la frecuencia con la que se presenta cada genotipo, teniendo en cuenta si contribuye con una o dos copias al pool génico de la población, o considerar la cantidad de individuos de cada uno de los genotipos respecto al total poblacional.

Con frecuencias

$$p = f(\mathbf{AA}) + 1/2 f(\mathbf{Aa}) \quad q = f(\mathbf{aa}) + 1/2 f(\mathbf{Aa})$$

Con números de individuos

$$p = \frac{(2n_{AA} + n_{Aa})}{2N} \quad q = \frac{(2n_{aa} + n_{Aa})}{2N}$$

Donde p y q representan las 2 variantes alélicas del gen y la suma de ambos será 1 ($p+q=1$). n_{AA} , n_{Aa} y n_{aa} representan el número de individuos de cada genotipo, y N el número total.

Es con estas herramientas que la frecuencia de los tres genotipos: AA, Aa, y aa, viene dada por los términos de la fórmula binomial, donde las frecuencias genotípicas en equilibrio se resuelven por el cuadrado de las frecuencias alélicas.

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

A a AA Aa aa

En el equilibrio, las frecuencias genotípicas poblacionales no cambian de generación en generación, es decir permanecen sin cambios significativos, si las frecuencias alélicas también son constantes.

La igualdad anterior se cumple siempre, este la población o no en equilibrio y sin embargo el resultado siempre debe ser 1 porque se trata de la suma de todas las frecuencias.

Prueba de bondad de ajuste

El modelo teórico desarrollado representa una situación estática donde la estructura génica de una población no cambia de manera significativa. Es decir que el no cumplimiento de la Ley implicaría el no cumplimiento de alguno de los supuestos mencionados con anterioridad, pudiendo estar la población bajo la acción de fuerzas evolutivas. Por lo tanto la ley de Hardy-Weinberg constituye una hipótesis nula, con el fin de explorar las desviaciones que ocurren entre las frecuencias genotípicas observadas y las calculadas de acuerdo a una presunción de equilibrio.

Para probar el equilibrio de Hardy-Weinberg se emplea la prueba de X^2 de bondad de ajuste, donde la hipótesis nula (H_0) plantea el cumplimiento de las condiciones del equilibrio, mediante la ecuación:

$$X^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

Donde O y E representan el número de individuos observados y esperados para cada genotipo determinado. Recordar que las comparaciones se hacen entre número de individuos, nunca entre las frecuencias genotípicas.

La hipótesis alternativa (H_1), referirá a la situación donde las diferencias encontradas entre el número de individuos esperados y observados, es significativa.

A la hora de resolver la prueba y aceptar o rechazar la hipótesis nula, se deberá tener en cuenta el valor teórico de X^2 con el nivel de significancia y los grados de libertad. Estos últimos se calculan como el número de clases genotípicas menos el número de alelos, por ejemplo si se cuenta con 2 alelos, los genotipos posibles son 3 (dada por las posibles combinaciones entre ellos) y el número de grados de libertad será 1. En general, se considera un nivel de significancia de 0,05; según la tabla de distribución, esto equivale a un X^2 de 3,84. Si el X^2 calculado es menor que el teórico, la H_0 se acepta y se considera que la población se encuentra en EHW, en caso contrario se rechazará la H_0 y se analizará qué fuerza está operando para apartar a esa población del equilibrio.

Alelos múltiples

Es el caso en que un gen o un locus en particular presenta más de dos formas alélicas a nivel de la población. Es decir, cuando en un locus hay más de dos alelos, el equilibrio genotípico viene determinado por el desarrollo multinomial ($p+q+r+\dots$), siendo “p, q, r”, ... las frecuencias de los alelos “A1, A2, A3, ...”.

Para los genes con múltiples alelos, los términos del cuadrado del binomio, se expanden conforme las variantes que se presenten. Citaremos un ejemplo de la presencia de tres alelos:

$$(p+q+r)^2 = p^2+q^2+r^2+2pq+2qr+2pr$$

Un ejemplo de ello sería el grupo sanguíneo humano AB0

Tabla 6.1: Frecuencia de grupos sanguíneos AB0

Tipo de sangre	Genotipo	Antígeno	Frecuencia fenotípica observada	Frecuencia fenotípica esperada
A	$I^A I^A, I^A i$	A	A	$p^2 + 2pr$
B	$I^B I^B, I^B i$	B	B	$q^2 + 2qr$
AB	$I^A I^B$	AB	AB	$2pq$
0	ii	ninguno	O	r^2

Genes ligados al sexo

En el sexo homogamético, como en las hembras de los mamíferos (XX) y los machos de las aves (ZZ), la relación entre frecuencias alélicas y genotípicas se comportan de la misma manera que en loci autosómicos, es decir, recibe de cada progenitor un alelo. Pero el sexo heterogamético, como los machos de los mamíferos (XY) o las hembras de las aves (ZW), recibe un único cromosoma X o Z de su progenitor. Concluimos que el sexo homogamético (XX) aporta 2/3 de los alelos de una población, mientras que el heterogamético (XY) aporta el 1/3 que resta.

El equilibrio genético para loci ligados al sexo no se alcanza en una generación de cruza- mientos al azar si las frecuencias alélicas difieren entre machos y hembras.

Procesos Microevolutivos

Los procesos microevolutivos que afectarán al equilibrio de Hardy-Weinberg que tratamos anteriormente, y que consiguientemente alterarán las frecuencias alélicas y genotípicas, se clasifican de la siguiente forma:

1. **Direccionales o sistemáticos:** ocurren en poblaciones que tienden al infinito. Cambian las frecuencias alélicas siendo predecible su magnitud y su dirección
 - a. Mutación
 - b. Migración
 - c. Selección

2. **Dispersivos:** ocurren en poblaciones pequeñas por error de muestreo. Cambian las frecuencias alélicas siendo predecible su magnitud, pero no su dirección
 - a. Deriva

Además, deben ser considerados los procesos de consanguinidad y recombinación, ya que estos también tienen un efecto sobre las frecuencias génicas de una población.

Mutación

Durante la replicación del ADN, necesaria para la división celular, pueden ocurrir, aunque de manera poco frecuente, errores en su copia. Como consecuencia de ellos, pueden presentarse variaciones en la secuencia tales como cambios de una sola base, inserciones o adiciones de nucleótidos, o deleciones de los mismos. Estos cambios se denominan *mutaciones*. Si las mismas se encuentran en la línea germinal, pueden ser transmitidas a su descendencia. Así, la acción de la mutación es la clave en la generación de nuevas variantes genéticas (alelos) y, por ende, un elemento de gran importancia para la evolución, ya que genera la variabilidad sobre la cual operan las restantes fuerzas evolutivas. Sin embargo, una mutación específica raramente ocurre en dos individuos diferentes, por lo que su frecuencia en la población se verá afectada o variará de acuerdo de las demás fuerzas evolutivas. La presencia de más de un alelo de determinado gen en una población nos permite hablar de *polimorfismo*, ya que nos referimos a las variantes que existen del gen. El término polimorfismo se ha definido como la presencia de dos o más alelos en un locus determinado en una población (ver capítulo 5 sobre polimorfismos).

Como mencionamos, las tasas de mutación son, en general, muy bajas, siendo éste el único proceso por el cual pueden aparecer nuevos alelos en una población, del orden de 10^{-8} a 10^{-9} por generación para la mayoría de los organismos celulares.

Si llamamos μ a la tasa de mutación que convierte un alelo A en a, y suponemos despreciable la tasa de mutación inversa (ya que este evento sería más raro aún), y teniendo una población con las frecuencias alélicas iniciales p_0 (de A) y q_0 (de a), en la generación siguiente, la frecuencia de A será:

$$p_1 = p_0 - \mu \cdot p_0 = p_0 \cdot (1 - \mu)$$

En la generación siguiente:

$$p_2 = p_1 - \mu \cdot p_1 = p_1 \cdot (1 - \mu)$$

Reemplazando p_1 en la expresión anterior:

$$p_2 = p_0 \cdot (1 - \mu) \cdot (1 - \mu) = p_0 \cdot (1 - \mu)^2$$

Lo cual nos permite deducir que en la n -ésima generación:

$$p_n = p_0 \cdot (1 - \mu)^n$$

Si queremos despejar n (el número de generaciones tras las cuales la frecuencia del alelo A será p_n), aplicamos logaritmo natural:

$$\ln p_n = \ln p_0 + n \cdot \ln(1 - \mu)$$

$$n = (\ln p_n - \ln p_0) / \ln(1 - \mu) = \ln(p_n/p_0) / \ln(1 - \mu)$$

Respecto a la tasa de mutación inversa (ν), si el valor de la misma no es despreciable, el cambio en la frecuencia de a luego de una generación será:

$$\Delta q = \mu p_0 - \nu q_0$$

Podemos hablar de equilibrio cuando $\mu p = \nu q$, es decir, cuando se equipare el número de alelos sufriendo mutación directa e inversa, lo cual puede ocurrir luego de muchas generaciones. En ese caso, y recordando que $p + q = 1$ (lo que nos ayudará a determinar la frecuencia p):

$$\mu p = \nu q = (1 - p) \cdot \nu = \nu - \nu p$$

$$\mu p + \nu p = (\mu + \nu) \cdot p = \nu$$

$$p = \nu / (\mu + \nu)$$

De forma análoga, si reemplazamos $p = (1 - q)$, llegamos a la expresión:

$$q = \mu / (\mu + \nu)$$

Las mutaciones se generan de forma azarosa a lo largo de todo el genoma (experimento de Luria-Delbruck). Si la misma resulta desfavorable para el individuo portador en el ambiente en el que vive y este individuo no puede dejar descendencia, la mutación desaparecerá y no se propagará en la población. Las zonas del genoma que resultan de vital importancia se encuentran muy conservadas, no sólo dentro de una misma especie sino también entre especies distintas. Esto indica que hay un importante control de selección contra las mutaciones deletéreas. A su vez, las regiones sin una función conocida, cuentan con un número de variaciones mayor, cambios que suceden en regiones no codificantes del genoma sin representación en el fenotipo, sobre el que actúa la selección natural. A pesar del factor azar, se estima que las mutaciones neutras son mayoritarias respecto a las deletéreas (figura 6.1), y más aún a las que podrían conferir alguna ventaja a la especie.

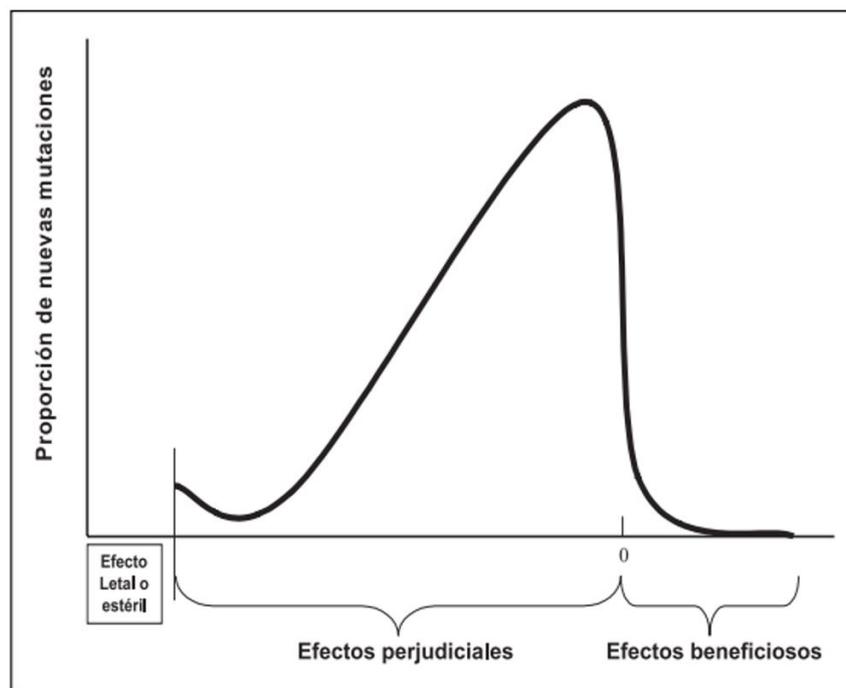


Figura 6.1. Distribución estimada de frecuencias de mutaciones en relación con su efecto en la eficacia biológica. Fuente: Tomado del capítulo "Selección natural y adaptación", J. J. Soler, en "Evolución: la base de la Biología" (2002).

Selección natural

Se sabe que el genotipo y el ambiente definen el fenotipo de los individuos. A nivel poblacional, estos fenotipos determinan diferentes capacidades para sobrevivir en un ambiente dado, además de la fecundidad y la capacidad de apareamiento, entre otras, que en última instancia determinan si ciertos alelos pasarán a formar parte del pool génico de las próximas generaciones.

La selección natural actúa sobre los fenotipos y a su vez, de forma indirecta sobre los genotipos, dependiendo del grado en el que estos definan los fenotipos. Este proceso puede verse como el

enriquecimiento de las poblaciones, en aquellos fenotipos que aseguran una descendencia más numerosa. Un claro ejemplo clásico de este proceso, es el de *Biston betularia* o “polilla moteada”. Existen al menos dos formas o variedades de esta polilla en cuanto a su color: *typica*, que posee una pigmentación clara, y *carbonaria*, de pigmentación oscura. Esta última se encontraba en una frecuencia baja en ciertas zonas de Inglaterra a mediados del siglo XIX, pero esta frecuencia comenzó a aumentar en dichas áreas a lo largo del tiempo. La explicación de este fenómeno es el llamado *melanismo industrial*; la variedad clara de la polilla estaba provista de un camuflaje efectivo contra sus depredadores, como ciertas especies de aves, al asemejarse a la corteza de los árboles, en general cubierta con líquenes. Sin embargo, con el desarrollo de la Revolución Industrial en Inglaterra y la contaminación resultante, los líquenes comenzaron a desaparecer y la superficie de los troncos de los árboles a oscurecerse. Esto presentó una desventaja para los individuos de pigmentación clara, que entonces serían fácilmente avistados por sus depredadores, y una ventaja para los de pigmentación oscura, quienes pasarían desapercibidos. Así, junto con otros procesos, la variedad *carbonaria* vio aumentada su frecuencia en poblaciones residentes en zonas industriales de Inglaterra. A mediados del siglo XX, las nuevas leyes de este país llevaron a disminuir la polución del aire debido a la actividad industrial, observándose una disminución de la frecuencia de la forma *carbonaria* y un aumento de la forma *typica*.

Con lo expuesto anteriormente, queda demostrado que la Selección Natural es el único proceso microevolutivo que explica de manera satisfactoria las adaptaciones. La Selección Natural “escoge” las variantes beneficiosas, en términos de fitness y supervivencia, para el individuo.

Tipos de Selección Natural según el cambio en la distribución de los fenotipos

La selección natural se puede clasificar según cuáles fenotipos son beneficiados:

Selección Estabilizadora: en la misma se ven favorecidos los fenotipos intermedios dentro de la campana de Gauss, es decir, aquellos cercanos a la media poblacional y así la curva tiende a estrecharse.

Por ejemplo: la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que los niños nacidos a término con bajo peso (menos de 2000 g) y aquellos con peso elevado (que superan los 4000 g) tienen menor supervivencia, como se muestra en la figura 6.2.

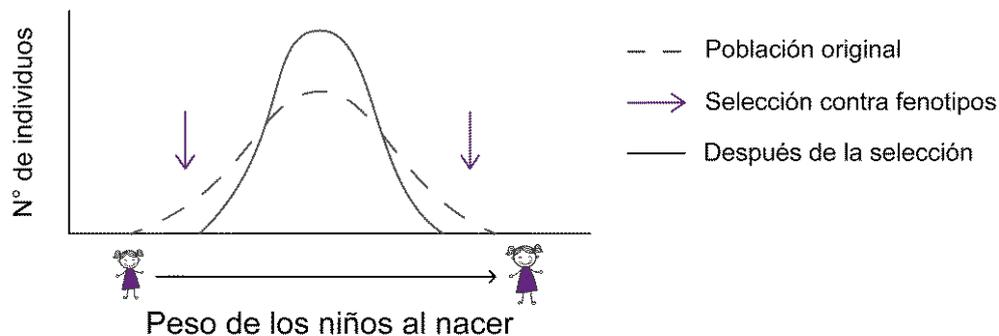


Figura 6.2. Selección Estabilizadora

Selección Direccional: en este tipo de Selección Natural, se ve favorecido un fenotipo del extremo de la curva, y ésta tenderá a desplazarse hacia el fenotipo que resulte más beneficioso. Usualmente se ve en poblaciones donde ha ocurrido un cambio ambiental. Por ejemplo: el ilustrado anteriormente de los 2 fenotipos de *Biston betularia*. En la época industrial, la curva se desplazó hacia el extremo donde se encontraba el fenotipo *carbonaria*, como se muestra en la figura 6.3.

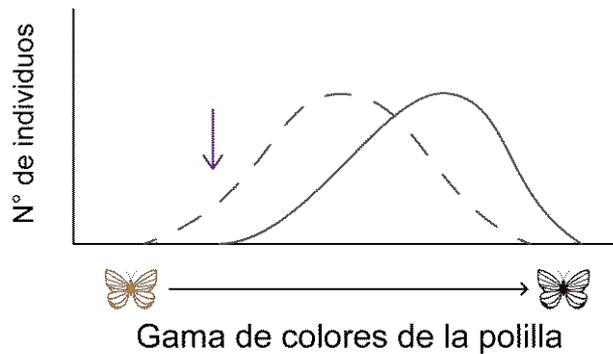


Figura 6.3: Selección Direccional

Selección Disruptiva: en este caso, se ven favorecidos los fenotipos de los extremos de la curva, y ésta tenderá a desplazarse hacia ellos, generando más de un pico en la misma. Es el único tipo de Selección Natural que puede generar una nueva especie. Un ejemplo es el del salmón plateado (*Oncorhynchus kisutch*); en esta especie, las hembras desovan y los machos fecundan los huevos. En el caso de éstos últimos, quienes tienen mayor éxito al acercarse al lugar de desove y fecundar, son los individuos de mayor tamaño, que pelean entre sí, y los de menor tamaño, ya que se acercan de forma sigilosa. Así, en la descendencia se observa una gran proporción de peces muy grandes y muy chicos, desplazándose de la media de la población original como se representa en la figura 6.4.

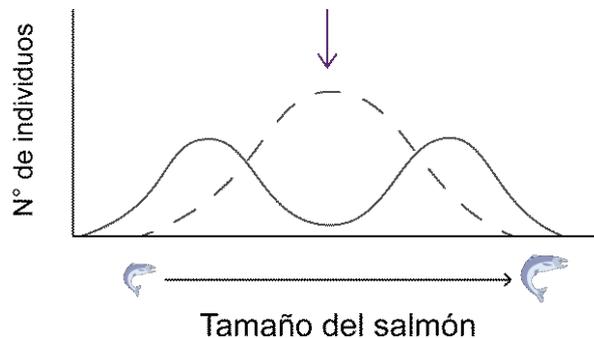


Figura 6.4 Selección Disruptiva

El efecto acumulador de la selección, a través de las generaciones, permite producir desde pequeños ajustes adaptativos, hasta obtener estructuras complejas.

Para medir la contribución del cambio acumulativo, generación a generación, debemos conocer el concepto **eficacia biológica (W)**. Ésta mide la proporción de descendientes que deja un individuo en la siguiente generación, es decir el éxito reproductivo o *fitness*. Para estimar las eficacias biológicas de los genotipos, se divide el número de descendientes de cada genotipo por el número de descendientes producidos por el genotipo con mayor progenie.

Cuando la eficacia biológica de un genotipo se ve disminuida en relación con otro, hablamos de **coeficiente de selección (S)**.

La relación entre eficacia biológica y coeficiente de selección se expresa de la siguiente manera

$$W = 1 - S \text{ y } S = 1 - W$$

Siguiendo con el ejemplo de *Biston betularia*, cuando el fenotipo *carbonaria* comenzó a contribuir con mayor cantidad de descendientes que *typica*, las frecuencias de los genotipos que dan el color oscuro se vieron aumentadas en detrimento de los que dan el color claro. Por lo tanto, la eficacia biológica de *carbonaria* era mayor que la de *typica*.

Por ello decimos que la Selección posiblemente sea la fuerza microevolutiva que produce mayores cambios en las frecuencias génicas y se expresan matemáticamente de la siguiente manera

Tabla 6.2: Tabla de frecuencias de Selección

	A^1A^1	A^1a^2	a^2a^2
Frecuencias Genotípicas iniciales	p^2	$2pq$	q^2
Eficacia Biológica (W)	W_{11}	W_{12}	W_{22}
Contribución de los genotipos a la población	p^2W_{11}	$2pqW_{12}$	q^2W_{22}
Frecuencias Genotípicas luego de actuar la Selección	$\frac{p^2W_{11}}{W}$	$\frac{2pqW_{12}}{W}$	$\frac{q^2W_{22}}{W}$

Selección contra alelo recesivo letal: cuando la Selección Natural ocurre contra un alelo recesivo (a), el modelo más sencillo es el que supone la dominancia completa por sobre el otro (A), donde, a medida que transcurren las generaciones, la frecuencia del alelo (a) tenderá a 0.

En el caso de los genes letales recesivos, la eficacia biológica (W) del genotipo homocigótico es 0 y consecuentemente el coeficiente de selección para ese genotipo (S) valdrá 1.

Tabla 6.3: Tabla de frecuencias de Selección contra un alelo recesivo letal

	A^1A^1	A^1a^2	a^2a^2	TOTAL
Frecuencias Genotípicas iniciales	p_0^2	$2p_0q_0$	q_0^2	1
Eficacia Biológica (W)	1	1	0	
Coefficiente de Selección (S)	0	0	1	
Frecuencias Genotípicas luego de actuar la Selección	$p^2 \cdot 1$	$2pq \cdot 1$	$q^2 \cdot 0$	$1-q_0^2$

Para este caso se podría calcular el efecto en la frecuencia alélica al cabo de n generaciones, de la siguiente manera:

$$q_n = q_0 / (1 + nq_0)$$

De la misma manera y despejando la ecuación puede calcularse la cantidad de generaciones hasta que cambie la frecuencia de q

$$n = 1/q_n - 1/q_0$$

Ejemplo: Cuando $s = 1$, el cambio de frecuencias génicas de 0,02 a 0,004 durará

$$n = 1/0,004 - 1/0,02 = 250 - 50 = 200$$

Es decir que tomaría 200 generaciones para cambiar la frecuencia de un gen letal del 12% al 4 por mil.

Ventaja del heterocigoto: supone la superioridad del heterocigoto. Para ello utilizaremos el caso más ilustrativo sobre la heterosis positiva para ejemplificarlo: la anemia falciforme, enfermedad hemolítica de transmisión genética, endémica de los países de África central donde se encuentra en frecuencias altas (en algunas poblaciones del continente africano el 45% es heterocigota para esta anemia). El alelo responsable de la enfermedad, en heterocigosis, produce inmunidad frente a la malaria. Ocurre una sustitución de glutamato por valina en la cadena β de la globina que produce un eritrocito en forma de hoz debido a un plegamiento anormal de la hemoglobina, siendo esto lo que impide el desarrollo del parásito que produce la malaria. Los individuos heterocigotas poseen la misma proporción de hemoglobina normal y anormal (el alelo salvaje, sensible a la malaria y el alelo mutado que produce la anemia). Es así como estos individuos poseen una ventaja frente a la malaria, sin estar afectados seriamente por la anemia.

Selección artificial

El objetivo de la selección artificial es elegir individuos con características, tanto cuantitativas como cualitativas, que deseamos se perpetúen en las siguientes generaciones. La selección artificial es utilizada en mejoramiento productivo, es así como individuos con mayor o mejor valor fenotípico para un determinado carácter, se seleccionan de una población. Ejemplo: muchos de los alimentos que consumimos actualmente son producto de generaciones de selección artificial y uno de los ejemplos más ilustrativos es el maíz. La domesticación del maíz estuvo ligada a proveer una fuente de alimento seguro y la posibilidad de aumentar la producción (mayor cantidad por unidad de superficie). La evidencia arqueobotánica ubica los orígenes del maíz en el área mesoamericana con dataciones que rondan los 7000 a 10000 años AP, la calidad del alimento, la difusión espacial y la manipulación del mismo nos lleva a un presente donde de la amplia gama de especies de maíz, solo unas pocas son cultivadas por el hombre, a escala industrial y consumidas.

Selección y mutación

Como ya mencionamos al hablar de mutaciones, éstas quedan luego bajo el efecto de la selección natural. Los efectos de ambos procesos se dan de forma simultánea, pudiendo ejercerse en el mismo sentido u oponerse, pudiendo llegar así a un equilibrio estable, donde la frecuencia q no cambia: $q = \sqrt{\mu / s}$. Si el alelo es dominante: $q = \mu / s$

Deriva génica

El modelo de Hardy-Weinberg supone que las frecuencias alélicas contribuyen al pool génico de la siguiente generación respetando estas frecuencias. Esto también se sostiene en poblaciones con un alto número de individuos, lo que permite que no se produzcan desviaciones de estas frecuencias en la formación de los cigotos. Sin embargo, la fluctuación por azar de las frecuencias alélicas en las sucesivas generaciones, debido al pasaje de gametas de forma no representativa y la unión formando los cigotos, es la fuerza predominante cuando los alelos de un gen no difieren en sus efectos sobre la supervivencia o la reproducción. Esta fluctuación actúa de forma más marcada cuanto más pequeña es la población, ya que a un mayor número de individuos de la generación parental las frecuencias alélicas observadas en la descendencia son similares a las esperadas. Como se expuso anteriormente, es uno de los procesos dispersivos, donde no se conoce ni la magnitud ni la dirección del cambio. Sabiendo esto, en una población pequeña, el número de gametas involucradas en la formación de los individuos de la siguiente generación es pequeño, y acentuándose de este modo, la posibilidad de no contribuir de forma representativa en función a las frecuencias alélicas originales, produciéndose un error azaroso en el muestreo gamético.

La deriva genética implica una disminución en la variabilidad de la población, pudiendo llevar a la desaparición de ciertos alelos o a la fijación de otros, luego de varias generaciones, como así también colabora a la divergencia genética entre poblaciones.

La deriva (s) puede calcularse como

$$s^2 = pq / 2N$$

Siendo éste el grado de desviación de las frecuencias alélicas, expresada como varianza. De esta ecuación se deduce que, para un N determinado, la deriva será mayor cuanto más cerca de la equifrecuencia se encuentren p y q , siendo máxima cuando $p=q=0,5$.

N es el *tamaño efectivo* de la población, es decir, el número de adultos reproductores. Si la proporción de sexos es desigual, entonces

$$N_e = 4 \times (N_{\text{♂}} \times N_{\text{♀}}) / (N_{\text{♂}} + N_{\text{♀}})$$

Si para cierta población se calcula s , en la siguiente generación de la misma habrá un cambio de las frecuencias alélicas debido a la deriva:

$$p' = p_0 \pm 2s$$

$$q' = q_0 \pm 2s$$

A mayor s (lo que ocurriría en el caso de un menor N_e) mayor será la fluctuación de las frecuencias en la siguiente generación. Esto podría llevar a que se produzca la fijación de uno de los alelos (frecuencia = 1) en pocas generaciones.

¿Qué sucede con la frecuencia de heterocigosis (H)? Al ir disminuyendo N_e , el efecto de la deriva será el de disminuir H :

$$H_n = [(1 - 1/(2N_e))^n] \cdot H_0$$

Siendo H_n la frecuencia de heterocigotas luego de n generaciones de apareamiento al azar, y H_0 la de la generación parental.

Efecto fundador

Cuando una fracción de una población se establece en un lugar, los individuos que fundan la nueva población pueden no ser representativos de la original en cuanto a frecuencias alélicas. Así es el ejemplo de la tribu Mlabri, un grupo étnico de Tailandia y Laos que fue catalogado como la comunidad con el efecto fundador más extremo. A inicios del siglo XXI se analizó una muestra de la población mencionada y se encontraron secuencias de ADN idénticas, lo que permitía establecer un efecto fundador a partir de una mujer y hasta 4 o 5 hombres para la tribu Mlabri.

Los ejemplos más estudiados se presentan en poblaciones humanas como es el caso de los grupos religiosos Amish llegados a América. Sin embargo, en el mundo animal y vegetal existen ejemplos ilustrativos de efecto fundador en función de la colonización de lugares antes no poblados por esas especies, en especial el caso de las Islas Galápagos.

Cuello de botella

En ciertos casos, algunas poblaciones pueden sufrir una reducción drástica de su número efectivo debido a desastres naturales, condiciones climáticas desfavorables, destrucción de su hábitat, etcétera. Nuevamente, los individuos que sobreviven pueden no ser genéticamente representativos de la población original, originando con el tiempo una población con frecuencias alélicas muy distintas a la “parental” u original (Figura 6.5). Un ejemplo es el del elefante marino del norte, *Mirounga angustirostris*, el cual sufrió una caza desmedida de sus individuos en el siglo XIX para la utilización de su grasa. Sobrevivieron muy pocos ejemplares, a partir de los cuales se llegó a una población con una variabilidad genética disminuida.

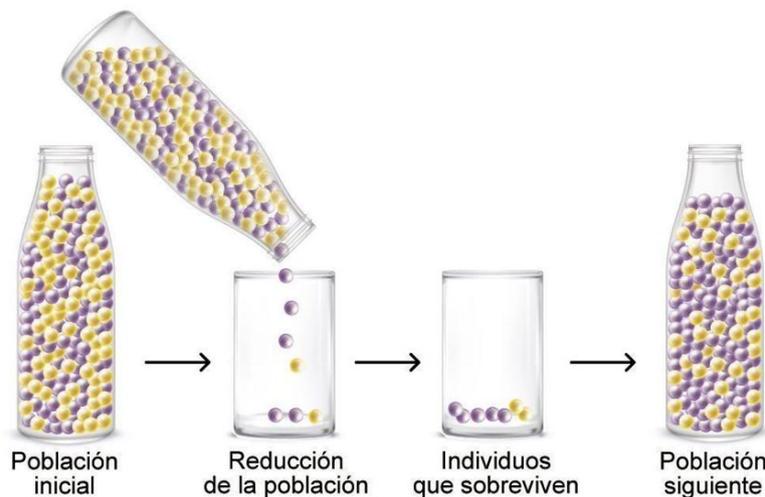


Figura 6.5. Representación del efecto de cuello de botella, donde las bolitas de diferente color representan variantes alélicas distintas.

Flujo genético

Una población no constituye en líneas generales, una unidad panmíctica, sino que por el contrario se halla conformada o subdividida por unidades de menor tamaño llamadas demos o subpoblaciones. De este modo, las distintas especies ocupan en la naturaleza áreas geográficas donde estas subpoblaciones están interconectadas y entre las que se produce flujo génico.

Tomaremos como unidad de análisis estas subpoblaciones que para facilitar la ejemplificación, mencionaremos como población de aquí en adelante. Así, en una población puede ocurrir el flujo de variantes alélicas debido a la incorporación de individuos de poblaciones adyacentes y se hará efectiva una generación después cuando haya habido reproducción entre los indivi-

duos de la población original o receptora (P_0) y los individuos provenientes de la población vecina o migrante (P_m). Esto puede provocar grandes cambios en las frecuencias alélicas, e incluso una pérdida de variantes (por emigración) o la introducción de variantes nuevas en dicha población (por inmigración de individuos), dependiendo de la diferencia entre las frecuencias para los alelos compartidos de la P_0 y la P_m , como así también de la magnitud de individuos que se desplacen de una población a la otra.

El flujo génico contribuye a disminuir la variabilidad genética entre poblaciones, y a aumentar la variabilidad intrapoblacional. En términos generales, es de esperar que el flujo génico o *migración* sea más usual entre poblaciones que se encuentren más próximas geográficamente, y esto se representa en uno de los modelos de análisis del flujo génico como es el llamado *aislamiento por distancia*, en el cual se afirma que la distancia genética es directamente proporcional a la distancia geográfica.

El flujo genético es un mecanismo por el cual las variantes pueden ser dispersadas. En este caso, el sentido de la variación puede ser predicho a partir del conocimiento de las frecuencias en las poblaciones parentales, teniendo en cuenta también el grado o tasa de migración (m).

Un ejemplo importante de flujo genético es el de la población europea arribada a Argentina durante las oleadas migratorias a fines del siglo XIX y principios del XX.

Modelo continente-isla

Supongamos una población con frecuencias alélicas p_0 y q_0 ; a ella migra otra población que posee distintas frecuencias de los mismos alelos, p_m y q_m . Suponiendo esta migración unidireccional, al cabo de una generación, el valor de la frecuencia p será igual a las frecuencias de ese alelo en cada población multiplicado por la fracción de la población correspondiente, sumadas:

$$p_1 = (1 - m) \cdot p_0 + m \cdot p_m \quad \text{siendo } 1-m \text{ la fracción autóctona de la población.}$$

A partir de esta ecuación, se deduce que el cambio en la frecuencia alélica entre generaciones es:

$$\Delta p = p_1 - p_0 = (1 - m) \cdot p_0 + m \cdot p_m - p_0 = p_0 - m \cdot p_0 + m \cdot p_m - p_0 = m \cdot (p_m - p_0)$$

Con esto vemos que este cambio depende de la tasa de migración y de la diferencia genética preexistente entre las poblaciones en cuestión.

En la siguiente generación:

$$p_2 = (1-m) \cdot p_1 + m \cdot p_m$$

Deducimos así que, en la n -ésima generación:

$$p_n = (1-m) \cdot p_{n-1} + m \cdot p_m$$

Reemplazando p_1 en p_2

$$p_2 = (1-m) \cdot (p_0 - m \cdot p_m + m \cdot p_m) + m \cdot p_m$$

y restándole p_m para determinar la diferencia genética entre poblaciones:

$$\Delta p = p_2 - p_m = (1-m)^2 \cdot (p_0 - p_m)$$

En la n -ésima generación:

$$\Delta p = p_n - p_m = (1-m)^n \cdot (p_0 - p_m) \quad \text{y} \quad p_n = p_m + (1-m)^n \cdot (p_0 - p_m)$$

Para despejar n , aplicamos \ln y llegamos a que

$$n = [\ln(p_n - p_m) - \ln(p_0 - p_m)] / \ln(1-m)$$

Otros modelos de flujo genético

El modelo en el cual nos basamos para el desarrollo matemático anterior está representado en la figura 6.6a. Existen otros modelos más complejos de flujo genético, los cuales no desarrollaremos en este capítulo.

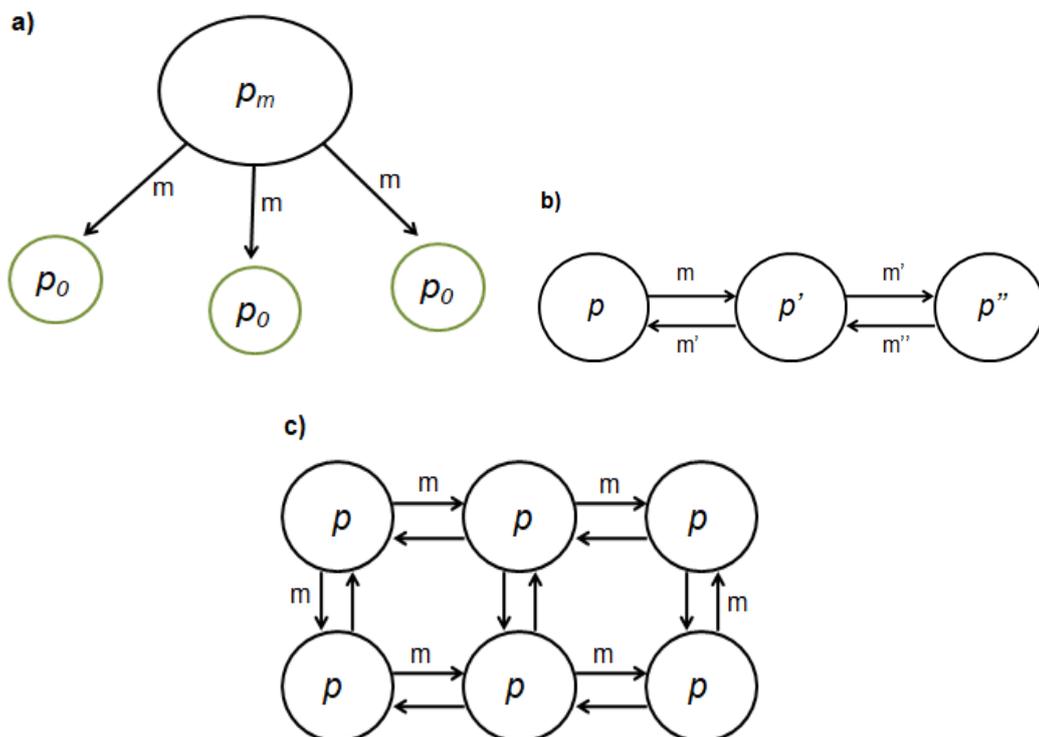


Figura 6.6 Modelos de flujo genético. a) Modelo continente-isla. b) Modelo de piedras de paso unidimensional c) Modelo de piedras de paso bidimensional.

Ligamiento y recombinación

Al hablar de variantes genéticas no hemos tenido en cuenta hasta ahora, la presencia simultánea de variantes en loci cercanos en función de estar ubicados sobre el mismo cromosoma. Si no están muy cerca, hay probabilidad de que estos genes recombinen. El proceso de *recombinación* se presenta durante la meiosis I entre cromosomas homólogos (los que portan los mismos genes), y es una fuente importante de variabilidad en las especies, ya que origina diferentes combinaciones de alelos, es decir, individuos con distintos genotipos. Pero estos loci pueden heredarse juntos o “en bloque” si están lo suficientemente cerca en el cromosoma; si su frecuencia de recombinación γ es menor a 0,5, se dice que están *ligados*. En este caso, deben pasar más generaciones que las esperadas para llegar al equilibrio de ambos en conjunto. A mayor ligamiento (o menor γ), se llega más lentamente al equilibrio.

En el caso de analizar la frecuencia con la que se observa una combinación alélica en las gametas de una generación, y compararla con la esperada si los loci fuesen independientes, podría verse una diferencia entre ambas llamada *desequilibrio de ligamiento D*, la cual puede describirse entre generaciones con la fórmula:

$D_n = (1-\gamma)^n \cdot D_0$. Al representarla (Figura 6.7), observamos que a menor γ , menor es la tendencia de D al valor 0 a lo largo de sucesivas generaciones.

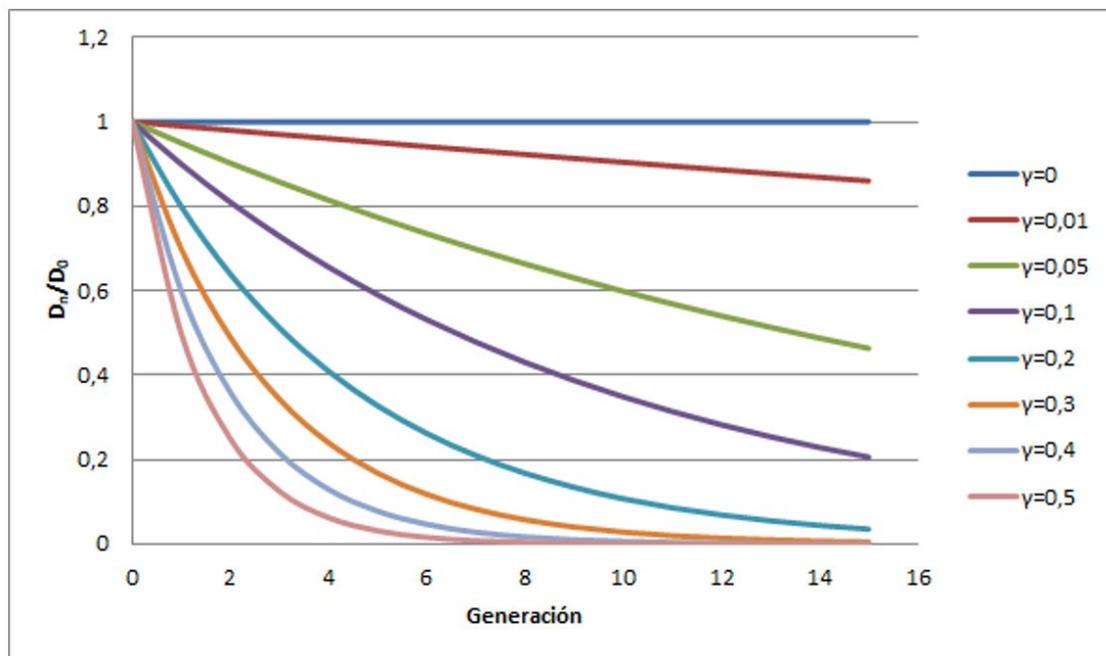


Figura 6.7. Tendencia al equilibrio ($D=0$) en función de γ y del número de generaciones. $\gamma=0,5$ es el caso de no ligamiento. D_0 = desequilibrio de base de la población.

Ejercicios

1- En una población de la provincia de Buenos Aires se determinaron los genotipos de todos sus individuos para uno de los locus autosómicos y dialélicos, que determinan el color del cabello.

Genotipos presentes

AA: 580 individuos

Aa: 400 individuos

aa: 240 individuos

¿Se encuentra esta población en equilibrio? Comprobar la hipótesis haciendo uso del test de bondad de ajuste.

TOTAL DE INDIVIDUOS: $580 + 400 + 240 = 1220$

Resolución

Frecuencias genotípicas observadas

$$AA = 580/1220 = 0,47$$

$$Aa = 400/1220 = 0,33$$

$$aa = 240/1220 = 0,2$$

Frecuencias alélicas

Frecuencia del alelo A

$$p = f(A) = f(AA) + \frac{1}{2} f(Aa) = 0,47 + \frac{1}{2} 0,33 = 0,635$$

Frecuencia del alelo a

$$q = f(a) = f(aa) + \frac{1}{2} f(Aa) = 0,2 + \frac{1}{2} 0,33 = 0,365$$

Para el equilibrio, las frecuencias genotípicas esperadas serían: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$

$$0,635^2 + 2 \cdot 0,635 \cdot 0,365 + 0,365^2 = 1$$

$$0,4 + 0,46 + 0,14 = 1$$

Para el equilibrio, el número esperado de individuos sería:

$$AA = 0,4 \cdot 1220 = 488$$

$$Aa = 0,46 \cdot 1220 = 561$$

$$Aa = 0,14 \cdot 1220 = 171$$

Para comprobar si la población se encuentra realmente en equilibrio, utilizaremos el test de χ^2 bondad de ajuste y para ello comenzaremos planteando las hipótesis a comprobar:

Hip 0: La población se encuentra en equilibrio

Hip Alternativa: La población no se encuentra en equilibrio

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{Observados} - \text{Esperados})^2}{\text{Esperados}}$$

$$\frac{(580-488)^2}{488} + \frac{(400-561)^2}{561} + \frac{(240-171)^2}{171} =$$

$$17,34 + 46,20 + 27,84 = \mathbf{91,38}$$

Para concluir con la comprobación del equilibrio de Hardy-Weinberg en esta población debemos conocer los grados de libertad (número de clases genotípicas menos el número de alelos). En nuestro caso, contamos con 3 clases genotípicas y 2 alelos ($3-2=1$).

Para 1 grado de libertad con un nivel de significación de 0,05 es de 3,84, por lo tanto, como nuestro valor de χ^2 es más elevado que el valor teórico, rechazamos la hipótesis nula. Nuestra población no se encuentra en equilibrio.

2- La fibrosis quística es una enfermedad autosómica recesiva que afecta principalmente los pulmones con una frecuencia mundial de 1:2500 niños nacidos vivos. ¿Cuáles serán las frecuencias alélicas y las frecuencias genotípicas en esta población, si consideramos que la misma se encuentra en equilibrio?

En una población con apareamiento al azar, la frecuencia en la que aparece el fenotipo dominante es 0,25. ¿Cuál será la frecuencia de los heterocigotos para dicha población?

En una población en equilibrio de Hardy-Weinberg, a medida que un gen recesivo es raro en la población, la proporción de individuos heterocigotas va en aumento en relación con los recesivos. Demostrar el enunciado utilizando las siguientes frecuencias: $q = 0,4$ y $0,02$.

3- En una población en equilibrio, la frecuencia de los homocigotas de cierto alelo A es 0,09. Sabiendo que el valor de la tasa de mutación es 0,0006, suponiendo despreciable la tasa de mutación inversa y que el equilibrio se logra luego de 100 generaciones, calcular la frecuencia alélica inicial de A,

Volver a realizar el cálculo suponiendo una tasa de mutación de 0,006

¿A qué conclusiones se puede llegar a partir de estos resultados?

Resolución

$$p^2=0,09 \rightarrow p= \sqrt{0,09} = 0,3$$

$$p_n= p_0.(1 - \mu)^n= 0,3.(1-0,0006)^{100}=0,2825$$

$$p_n= p_0.(1 - \mu)^n= 0,3.(1-0,006)^{100}= 0,1643$$

Al aumentar la tasa de mutación, la frecuencia del alelo en cuestión será más baja al cabo del mismo número de generaciones, ya que hablamos de mutación directa (ese alelo cambia a otro).

4- En una población de *Coccinella septempunctata*, se analizó la descendencia promedio de los individuos con los siguientes genotipos:

Genotipo	N° inicial	N° final
AA	200	200
Aa	200	150
aa	200	80

- Calcular la eficacia biológica en cada genotipo.
- Calcular el coeficiente de selección de cada uno de los genotipos.
- Siendo la frecuencia p del alelo A igual a 0,7, ¿cuál será su frecuencia en la generación siguiente?

Resolución

a) Eficacia biológica de AA (w_{AA}): $200/200 = 1$

Eficacia biológica de Aa (w_{Aa}): $150/200 = 0,75$

Eficacia biológica de aa (w_{aa}): $80/200 = 0,4$

b) El coeficiente de selección (s) ($1 - w$):

contra el genotipo AA: $s = 1 - 1 = 0$

contra el genotipo Aa: $s = 1 - 0,75 = 0,25$

contra el genotipo aa: $s = 1 - 0,4 = 0,6$

c) Tras una generación de selección, las frecuencias genotípicas relativas esperadas serán:

Frecuencia del genotipo AA: $p^2 w_{AA} / \underline{W}$

Frecuencia del genotipo Aa: $2pq w_{Aa} / \underline{W}$

Frecuencia del genotipo aa: $q^2 w_{aa} / \underline{W}$

Dónde W (eficacia biológica media de los tres genotipos) =

$$p^2 w_{AA} + 2pq w_{Aa} + q^2 w_{aa} = (0,7)^2 (1) + 2(0,7)(0,3)(0,75) + (0,3)^2 (0,4)$$

$$= 0,49 + 0,315 + 0,036$$

$$= 0,841$$

Así:

$$\text{Frecuencia del genotipo AA: } p^2 w_{AA} / \underline{W} = 0,49 / 0,841 = 0,582$$

$$\text{Frecuencia del genotipo Aa: } 2pq w_{Aa} / \underline{W} = 0,315 / 0,841 = 0,374$$

$$\text{Frecuencia del genotipo aa: } q^2 w_{aa} / \underline{W} = 0,036 / 0,841 = 0,042$$

$$Y, \text{ por tanto, } p = 0,582 + 1/2 \cdot 0,374 = 0,76$$

$$q = 0,042 + 1/2 \cdot 0,374 = 0,24$$

5- Una población de *Eudypetes chrysocome* está formada por 1000 machos y 1000 hembras fértiles. Se ha determinado que cada 100 individuos de la población, 60 presentan el alelo A.

- a) ¿Cuál será el intervalo en el que fluctuarán las frecuencias de A y a en la siguiente generación?
- b) Repetir el cálculo si sólo se contara con 2 hembras y 2 machos fértiles. ¿Qué puede concluir al respecto?

Resolución

a) $N = \text{machos} + \text{hembras} = 2000$

$$p = 60/100 = 0,6$$

$$q = 1 - p = 0,4$$

$$s^2 = pq/2N = 0,6 \cdot 0,4 / 4000 = 0,0006 \quad (s = 0,024)$$

$$p' = 0,6 \pm 2s = 0,6 \pm 0,024$$

$$q' = 0,4 \pm 0,024$$

La frecuencia de A fluctuará entre 0,5846 y 0,6154

La frecuencia de a fluctuará entre 0,3846 y 0,4154

b) $N = 4$

$$s = \sqrt{(0,6 \cdot 0,4 / 4)} = 0,1732$$

$$p' = 0,6 \pm 0,3464$$

$$q' = 0,4 \pm 0,3464$$

La frecuencia de A fluctuará entre 0,2536 y 0,9464

La frecuencia de a fluctuará entre 0,0536 y 0,7464

En el caso b), con un número efectivo menor, la variación de las frecuencias en la próxima generación resulta mayor, acercándose uno de los alelos a la fijación (en este caso, en una generación).

6- A una población de 1000 individuos, migran 250 de la misma especie. La frecuencia de cierto alelo es 0,5 en la población autóctona y 0,8 en la migrante.

- a) ¿Cuál será la frecuencia de dicho alelo en la siguiente generación?
- b) Repita el cálculo con un número de migrantes de 700

Resolución

$$a) m = 250/1250 = 0,2$$

$$p_1 = (1 - m) \cdot p_0 + m \cdot p_m = (1 - 0,2) \cdot 0,5 + 0,2 \cdot 0,8 = 0,56$$

$$b) m = 700/1700 = 0,4$$

$$p_1 = 0,6 \cdot 0,5 + 0,4 \cdot 0,8 = 0,62$$

Referencias

- Cabrero Hurtado, J. & Camacho, J. P. M. (2002). Fundamentos de genética de poblaciones. En Soler Cruz, M. (Coord.), *Evolución: la base de la Biología*. Editorial Proyecto Sur, España, pp. 83-126.
- Cardoso, A. A. (2005). Variabilidad genética del elefante marino del norte, *Mirounga angustirostris* en Isla Guadalupe, Islas San Benito e Isla de Cedros, México. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.
- Cascante, J. E., Cepeda, L. V. & Suárez, S. (2017). *Modelo de Malaria y Anemia Falciforme en la población Africana*. Departamento de Ingeniería Biomédica, Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia.
- Cavalli-Sforza, L.; Menozzi, P. & Piazza, A. (1995). *The History and Geography of Human Genes*. Princeton University Press, Princeton.
- Eiberg, H., Troelsen, J., Nielsen, M., Mikkelsen, A., Mengel-From, J., Kjaer, K. & Hansen, L. (2008). Blue eye color in humans may be caused by a perfectly associated founder mutation in a regulatory element located within the HERC2 gene inhibiting OCA2 expression. *Human genetics*, 123(2), 177-187.
- Gillespie, J. H. (1998). *Population Genetics: A concise guide*. The Johns Hopkins University Press. Baltimore and London.
- Gross, M. (1985). Disruptive selection for alternative life histories in salmon. *Nature*, 313, 47-48.
- Haldane, J. B. S. (1949). Disease and Evolution. *Ricerca Scientifica*, 19, 68-76.
- Hedrick, P. W. (2000). *Genetics of populations*, 2nd Ed. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 553 pp.
- Kimura, M. (1983). *The neutral theory of molecular evolution*. New York: Cambridge University Press, 367 pp.
- Oota H., Pakendorf B., Weiss G., von Haeseler A., Pookajorn S., et al. (2005). Recent Origin and cultural reversion of a hunter-gatherer group. *PLoS Biol.*, 3(3), e71.
- Soler, J. J. (2002). Selección natural y adaptación. En Soler Cruz, M. (Coord.), *Evolución: la base de la Biología*. Editorial Proyecto Sur, España, pp. 127-158.

CAPÍTULO 7

Bioética y legislación sobre genética en Argentina

Cecilia I. Catanesi, Alejandro del Palacio y Héctor R. Ferrari

*Sus científicos estaban tan preocupados por saber si podían o no,
que no se detuvieron a pensar si deberían*

Dr. Ian Malcolm, JURASSIC PARK

El rápido avance de la investigación científica ha permitido a la humanidad obtener una enorme cantidad de información genética, la cual puede ser utilizada de diversas maneras, no siempre adecuadas. El clonado de mascotas, los organismos modificados genéticamente, son sólo algunos ejemplos que han generado un amplio debate en los ámbitos científico y social, sin llegar hasta hoy a un acuerdo general en cuanto al uso y aplicación de la información y la tecnología en esas áreas. A partir de la secuenciación completa del genoma humano y de otros organismos, surgieron nuevas posibilidades, pero también nuevos e inesperados riesgos e interrogantes acerca del futuro de la humanidad y la biósfera.

La Bioética se ocupa del estudio de los aspectos éticos de las ciencias de la vida y la relación del ser humano con los seres vivos y el medio ambiente, a través de la reflexión filosófica del “qué debo hacer” y el “por qué debo hacer esto”. Su misión es regular la conducta en el campo de las biociencias y la biotecnología. El ser humano, en su afán de conocimiento, ha hecho ciencia desde siempre buscando los cómo y los por qué, lo que ha posibilitado comprender el entorno y dominar la naturaleza. En un sentido más amplio, la ética debe ser considerada como una constante disciplina para la vida, pues nos marca el camino para realizar nuestras labores con eficiencia y mantener una actitud de rechazo frente a todo lo que minimice nuestra dignidad y moral.

Investigación genética en seres humanos

Durante el siglo XX se produjeron varios ejemplos lamentables de experimentación aberrante que nada tiene que ver con el avance científico, algunos de ellos muy conocidos, como las atrocidades realizadas por el sistema nazi en la segunda guerra mundial. En Argentina existen

también algunos ejemplos de excesos cometidos; tal es el caso ocurrido en 1986 en la localidad de Azul, provincia de Buenos Aires, donde se probó clandestinamente el virus de la viruela recombinado con virus de la rabia sin autorización. Con el objeto de desarrollar una vacuna de doble acción, este recombinante fue inoculado en vacas lecheras cuya leche fue comercializada sin que los experimentadores dieran aviso, los mismos provenían del Instituto Wistar y la Organización Panamericana de la Salud (PAHO). Un becario de CONICET tomó conocimiento por encontrarse trabajando en el Instituto Wistar y denunció esta maniobra, gracias a lo cual este repudiable hecho llegó a oídos del público. Como consecuencia, estudios posteriores realizados a los ordeñadores de las vacas inoculadas mostraron anticuerpos, en unos contra la rabia y en otros contra la varicela.

A partir de episodios condenables ocurridos en distintos momentos, fueron estableciéndose normativas a nivel internacional para impulsar una regulación ética de la investigación científica. Se desarrollaron así una serie de documentos, contándose entre los más importantes el Código de Ética Médica de Nüremberg (1947), la Declaración de Helsinki de Normas para la investigación en seres humanos (1964, 1975), el Informe Belmont sobre Principios Éticos y guías para la protección de sujetos humanos sometidos a investigación (1979), el Convenio sobre los Derechos Humanos y la Biomedicina (1997), la Declaración Universal sobre el Genoma Humano (1997), el Documento de las Américas (2005), la Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos (2005) y otros escritos vigentes que centran la atención en el respeto a la dignidad del ser humano. Estos documentos establecen que la generación de nuevos conocimientos nunca debe estar por encima de los derechos e intereses de las personas que participan en una investigación. Entre las condiciones que una investigación debe cumplir, es indispensable reducir al mínimo los riesgos posibles para los participantes y dichos riesgos deben ser justificados con resultados útiles que pueda brindar la investigación. Es indispensable la integridad del voluntario, evitándose su sufrimiento psicológico o físico y respetándose su voluntad en todo momento de la investigación, contando siempre con un consentimiento informado voluntario. En definitiva, la investigación debe apuntar al bienestar de los participantes, concepto que se conoce como principio de beneficencia. Asimismo, debe reducirse al mínimo también el riesgo ambiental.

Comités de ética y comunidades vulnerables

En la actualidad, todo proyecto de investigación que quiera desarrollarse involucrando seres humanos debe ser previamente evaluado por un Comité de Ética; éste es un órgano conformado por personas de distintas disciplinas que evalúan y asesoran sobre aspectos bioéticos relacionados al tema de investigación propuesto y, finalizada la evaluación, entregan un dictamen sobre el proyecto evaluado. El Comité tiene la responsabilidad de verificar que se protejan la seguridad, integridad y derechos de los participantes del estudio a través del análisis de los procedimientos que se proponen, lo cual queda establecido mediante legislación. En la provin-

cia de Buenos Aires la Ley sobre Investigaciones Científicas en Seres Humanos instituye que dichas investigaciones deben cumplir criterios de respeto a la dignidad y proteger los derechos y el bienestar de los participantes, lo que queda a consideración del comité de ética (Ley 11.044 1991). Todo Comité de Ética debe ejercer sus tareas libre de la influencia de aquellos investigadores o patrocinadores que conducen o intervienen en el estudio. La operativa está detallada en la Guía para Investigaciones con Seres Humanos aprobada por la Resolución 1480/2011 del Ministerio de Salud de la Nación.

En el sistema público de salud argentino, cada hospital que tenga cierto nivel de complejidad debe contar con un Comité Hospitalario de Ética que cumplirá funciones de asesoramiento, estudio, docencia y supervisión de la investigación respecto de cuestiones éticas que surgen de la práctica hospitalaria. Estos Comités deben evaluar todo proyecto de investigación que se quiera llevar a cabo en el ámbito hospitalario (Ley 24742, 1996).

Por su parte el CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) cuenta con un Comité de Ética que evalúa el desarrollo de las actividades científicas y tecnológicas comprendidas en las diferentes áreas de investigación. Basándose en principios éticos reconocidos internacionalmente para la actividad científica, dicho Comité tiene la misión de evaluar problemas pertinentes a estos principios que surjan en los proyectos que se llevan a cabo, ya sea en cuanto a los procedimientos como a los resultados obtenidos de la actividad de investigación. El CONICET posee una reglamentación estricta a aplicar en los casos en que un proyecto de investigación involucre muestras biológicas de seres humanos o intervención sobre los mismos, en particular si la propuesta comprende alguno de los siguientes objetos y usos: estudios farmacológicos y tecnológicos; estudios clínicos, quirúrgicos y básicos; estudios epidemiológicos, sociales y psicológicos; uso de equipamiento médico; uso de equipamiento de diagnóstico por imágenes y de radiación; información de historias clínicas; uso de muestras biológicas; estudios de comunidades aborígenes. Cualquier proyecto presentado ante el CONICET que implique alguno de estos aspectos, debe disponer previamente de un informe emitido por un comité de ética reconocido. Asimismo, el establecimiento de normativas para la investigación en este aspecto, se replica también en la mayoría de las sociedades científicas nacionales e internacionales vinculadas a estudios en seres humanos.

En toda investigación con seres humanos es indispensable elaborar una cartilla de Información que se entrega al participante, y contar con la firma de un formulario de consentimiento informado; el texto de ambos documentos debe estar aprobado previamente por un Comité de Ética. Al firmar el consentimiento, cada participante de la investigación expresa, en forma voluntaria y libre de coerción, su decisión de tomar parte en una investigación una vez que ha recibido información acerca de los aspectos relevantes del proyecto a realizar (Res. 1480/2011 Min. de Salud de la Nación).

Debe guardarse especial cuidado en las investigaciones que involucren comunidades que puedan considerarse vulnerables. Entendiendo como comunidad vulnerable a un grupo de individuos que por distintas circunstancias no puedan comprender las características de una investigación o bien no puedan expresar su voluntad de participación y, por lo tanto se encuen-

tren en desventaja al momento de tener que defender sus derechos. Esto se da en casos de condiciones desfavorables en el aspecto social, cultural, educativo o económico, que hagan a un grupo de personas más susceptible a ser influenciado por la expectativa de recibir un beneficio por participar en la investigación (incentivo indebido) o a ser víctima de una amenaza o un daño en caso de rehusarse a participar (coerción) (Res. 1480/2011 Min. de Salud de la Nación; Ley 11.044 de la prov. de Buenos Aires). Tal es el caso de los niños, las personas analfabetas o las comunidades nativas entre otros grupos de personas con vulnerabilidad, que pueden resultar damnificados durante la realización de una investigación. Cuando un grupo de personas sea considerado como población vulnerable, la investigación sólo será justificada si los individuos participantes pueden beneficiarse con los resultados, a la vez que deben extremarse los recaudos en cuanto al consentimiento otorgado por cada participante. Particularmente, para realizar investigaciones sobre comunidades indígenas (nativas) la Ley 25.517 (2001) establece en su artículo 3ro. que “todo emprendimiento científico que tenga por objeto a las comunidades aborígenes, incluyendo su patrimonio histórico y cultural, deberá contar con el expreso consentimiento de las comunidades interesadas.”

Bancos de material genético

Existen distintos tipos de bancos de material genético, tanto por el tipo de material e información que coleccionan como por el objetivo para el que han sido creados. Muchos países cuentan con bancos que almacenan datos genéticos de personas que han cometido delitos, con el fin de detectar la reincidencia en hechos delictivos por parte de los individuos allí registrados. En Argentina se han propuesto distintos proyectos de ley al respecto, aunque la mayoría no fueron aprobados, salvo en contados casos como en la provincia de Mendoza, donde un Registro Provincial de Huellas Genéticas Digitalizadas almacena muestras de ADN de las personas arrestadas o condenadas y del personal policial, penitenciario, y demás fuerzas de seguridad (Ley provincial 8.611). A nivel nacional, se ha implementado un Registro Nacional de Datos Genéticos Vinculados a Delitos contra la Integridad Sexual (Ley Nacional 26.879) dedicado a la recopilación de perfiles de 20 marcadores genéticos obtenidos de evidencias de delitos sexuales de los cuales aún no se ha localizado su autor (o autores). Estos perfiles genéticos permitirán su identificación en el futuro, y determinar casos no relacionados cometidos por un mismo autor (casos seriales). Dicho Registro también recopila los perfiles genéticos de individuos condenados por sentencia firme por delitos de la misma índole.

También a nivel nacional, nuestro país cuenta con el Banco Nacional de Datos Genéticos (BNDG, Ley 23511), que se creó en 1987 gracias a la labor y perseverancia de quienes integraban la organización Abuelas de Plaza de Mayo en la búsqueda de sus nietos biológicos, privados de la identidad durante el gobierno de facto entre los años 1976 y 1983. A través de reuniones con destacados científicos en distintas partes del mundo, las Abuelas buscaron la forma de que su sangre pudiese servir para identificar a sus nietos. Gracias a la colaboración

de la genetista estadounidense Mary-Claire King y un importante equipo de investigadores, se logró desarrollar un “índice de abuelidad” para determinar la filiación de un niño en ausencia de sus padres mediante el análisis genético de sus abuelos y abuelas. De esta manera, el BNDG es un archivo público de almacenamiento sistemático de material genético y muestras biológicas de familiares de personas secuestradas y desaparecidas como consecuencia de la represión ilegal ejercida por la dictadura militar. Su misión es realizar pruebas genéticas para filiación entre posibles nietos y abuelos, cuando los padres del niño fueron secuestrados y desaparecidos por el Terrorismo de Estado, y también esclarecer delitos de lesa humanidad (Ley 26.548, 2009). El BNDG se ocupa de la obtención, el almacenamiento y el análisis de las muestras genéticas, garantizando la conservación de los perfiles genéticos de cada uno de los miembros de las familias que sufrieron el secuestro y desaparición de algún integrante y que depositaron sus muestras en él. El análisis permite la identificación de vínculos biológicos mediante el estudio de polimorfismos genéticos y el posterior cálculo de índices de paternidad, hermandad o abuelidad, dependiendo estos índices del material que se disponga como muestras para analizar. Entre sus funciones también se incluye la identificación genética de restos humanos, víctimas de desaparición forzada. El trabajo de esta institución facilitó un importante desarrollo de la genética forense en nuestra región, e incluso a nivel internacional.

Diagnóstico Genético

En genética médica, el diagnóstico genético se realiza para definir una patología específica y poder asesorar y determinar un posible tratamiento. Esta tarea que a primera vista parece positiva, no siempre resulta acorde a la voluntad del paciente, quien puede no querer conocer un determinado resultado de este análisis. Tal es el caso de la Enfermedad de Huntington, de herencia autosómica dominante, para la cual se cuenta con una prueba genética pero, al presente, los posibles tratamientos para su cura se encuentran en fase de prueba. Un familiar de un paciente que padece Huntington puede conocer su propia situación de portador de la variante patológica o no portador a través de un simple estudio genético. Sin embargo, puede producirse un rechazo al diagnóstico ya que portar esa variante implica que en algún momento de la vida adulta se manifestará la enfermedad. El miedo a padecer la enfermedad lleva a muchos a preferir mantenerse en la duda de ser portadores, antes que confirmarlo. Otros en cambio, afrontan el diagnóstico genético como una oportunidad de eliminar incertidumbres y planificar el futuro.

Con respecto al diagnóstico genético prenatal, se utiliza para detectar anomalías del feto dentro del útero materno, siendo de importancia su aplicación en casos con alto riesgo de tener hijos con trastornos genéticos o cromosómicos. Este tipo de diagnóstico es particularmente problemático en muchos aspectos, tanto desde la perspectiva médica como desde la ética y social, ya que intervienen intereses relacionados con la salud del individuo en gestación, las reglamentaciones vigentes, las creencias religiosas y las diversas posturas filosóficas de los

padres, los médicos, los científicos de área, e incluso de la sociedad. Estos estudios en cuestión deben ofrecerse por igual en cualquier caso, más allá de la opinión personal de la paciente embarazada sobre el aborto, a la vez que ella también debe tener la opción de rechazar la prueba una vez que se le ha informado en detalle. Por otra parte, la importancia de ofrecer este diagnóstico a toda la comunidad radica en la posibilidad de decidir con anticipación los procedimientos a emplear en el parto y en la etapa neonatal.

Otro tema a destacar es el diagnóstico genético preimplantatorio (DGP), una técnica que permite evaluar la “salud genética” de un embrión vivo *in vitro*, antes de decidir su transferencia o no al útero materno, con el fin de evitar el nacimiento de niños con enfermedades hereditarias graves. Es una técnica médica que está bajo fuerte controversia desde el punto de vista bioético y jurídico, porque conlleva la utilización de los procedimientos de reproducción asistida, la generación de un número de embriones superior al de un ciclo normal y la manipulación y selección de embriones, así como el descarte de los que se consideren no aptos. La polémica se acentúa más con el denominado DGP extensivo, el cual busca la selección de los embriones, no ya sólo para descartar los que presenten alguna anomalía genética, sino también con fines terapéuticos para terceros, buscando compatibilidad del embrión con un hermano vivo enfermo. Una vez nacido, actuaría como futuro donante cediéndole a su hermano las células madre del cordón umbilical o, mediante un trasplante, de la médula ósea. Un conflicto similar surge en los casos en que el DGP se plantea como un instrumento para llevar a cabo medicina de tipo perfecto. Estas estrategias de selección de embriones imponen un gran desafío ético que nos conecta con el problema eugenésico.

Farmacogenética

No todos los individuos tratados con un fármaco responden de la misma forma, sino que se han registrado pacientes con dificultades metabólicas para procesar algunos medicamentos, sufriendo toxicidad al ser tratados con éstos. La farmacogenética se ocupa de estudiar las variaciones en la secuencia de ADN de los individuos en relación con la respuesta a los fármacos, y permite comprender los mecanismos moleculares por los cuales actúan. A partir de la secuenciación del genoma humano completo en 2003 se inició un avance sin freno en esta área, hoy potenciada con distintos proyectos internacionales. Entre ellos, el Proyecto Varioma Humano apunta a describir variantes genéticas regionales y compartirlas con la comunidad científica mundial, con el objetivo de reducir las consecuencias de enfermedades que tienen una base genética.

La implementación de estudios farmacogenéticos en salud pública permitiría definir en cada paciente a tratar el tipo de droga farmacológica y la dosis adecuados, sorteando las dificultades que interpone la diversidad genética existente entre individuos (y entre poblaciones) para garantizar la eficacia de los tratamientos médicos y evitar reacciones adversas que pueden incluso llevar a la muerte en algunos casos. Actualmente las autoridades regulatorias están comen-

zando a implementar que los medicamentos detallen en sus etiquetas o prospectos los genes o grupos de genes que intervienen en el procesamiento de los fármacos en cuestión. Esta información acompañada de un análisis farmacogenético individual posibilita realizar tratamientos personalizados, evitando efectos farmacológicos no deseados y someter al paciente a la administración de medicación que no será tolerada o procesada por su organismo de forma correcta. En Argentina la autorización para ensayos farmacogenéticos, la regulación de la utilización de drogas con fines curativos y la información que acompaña los medicamentos están bajo la supervisión de la Administración Nacional de Medicamentos y Tecnología Médica, ANMAT (por ejemplo: disposición 10037-2015 sobre información de la vía metabólica mediada por CYP3A4, CYP2C19, CYP1A2, y CYP2B6).

Confidencialidad de la información genética

El material genético de un individuo expresa las características hereditarias de la persona. A diferencia de otros tipos de información biológica, el conocimiento de los datos genéticos humanos repercute no sólo en la persona que los porta, sino también en otros individuos. En el conjunto familiar y en la descendencia, esta información puede dar indicios de predisposición a ciertas enfermedades con componente genético, mientras que en poblaciones pequeñas y aisladas puede tener un impacto a nivel social. Por ello, la información genética individual debe considerarse personal y perteneciente a la vida privada de la persona. Debe protegerse la intimidad genética, que sólo puede ser divulgada con el consentimiento expreso del interesado. En este sentido, toda información obtenida en el marco de una investigación debe manejarse sin identificar a los individuos participantes y garantizando la anonimidad de las muestras utilizadas, mientras que el acceso a la información surgida de un diagnóstico debe restringirse al individuo diagnosticado. La confidencialidad garantiza el respeto a la vida privada, en la cual el individuo decide el manejo de su información genética, lo que se conoce como derecho a la autodeterminación informática.

Modificaciones genéticas

En la actualidad se realizan distintos tipos de manipulación genética ya sea con fines de investigación o biomédicos, o bien para obtener alimentos de mayor contenido nutritivo o con mayor capacidad de crecimiento. Entre estas estrategias se encuentran las técnicas de edición génica, la creación de organismos modificados genéticamente (OMG) y la clonación de organismos.

Terapia génica y edición de genes

Las terapias génicas implican la corrección o inserción de un gen (o varios genes) en las células de un individuo con fines curativos, modificando así el fenotipo celular patológico. Existen distintos tipos de terapias génicas aplicables al ser humano:

- Terapia génica en células somáticas, cuando esta modificación se realiza en **células somáticas diferenciadas**, ya sea tanto del adulto como del feto; la modificación tiene efecto únicamente sobre el individuo tratado.
- Terapia génica en línea germinal: en el caso que la modificación se realice en la **línea germinal**, es decir sobre las gametas, sobre la cigota, o el embrión temprano (primeros estadios de división), el efecto se transmite potencialmente a las generaciones futuras. En este último caso, la normativa internacional se manifiesta en contra, poniendo como condición para la aplicación de cualquier intervención genética, que ésta no tenga el objetivo de modificar el genoma de la descendencia. Por su parte, la Declaración de la UNESCO sobre las responsabilidades de las generaciones actuales para con las generaciones futuras (1997) deja en claro la necesidad de proteger el genoma humano y preservar su diversidad biológica. En Argentina, el Código Civil y Comercial (Art. 57) prohíbe las prácticas que tengan por fin o consecuencia producir una alteración genética del cigoto o del embrión cuando esa alteración se transmita a la descendencia, ya que esto atenta contra el derecho de los descendientes a un genoma no manipulado y el derecho a la identidad genética.

En años más recientes se han implementado nuevas tecnologías de **edición de genes**, entre las cuales ha tenido gran impacto el uso de secuencias CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) presentes en bacterias y arqueobacterias, que se asocian a un grupo de genes llamados Cas. El **sistema CRISPR-Cas** funciona como un mecanismo de defensa para los microorganismos que lo portan, ya que utiliza hebras de ARN antisentido como secuencias de memoria de infecciones pasadas. El desarrollo de la nucleasa Cas9 dirigida por ARN ha permitido la modificación focalizada del ADN de células eucarióticas, generando un sistema de mutagénesis dirigida muy eficaz en tratamientos celulares ex-vivo de células somáticas. Actualmente existen varios ensayos clínicos en curso para tratamiento del HIV, HPV, talasemias, hemofilias, tumores y otros, que pueden consultarse en la página de Clinical Trials (www.clinicaltrials.gov). Ésta es una base de datos de estudios clínicos financiados con fondos públicos y privados realizados en todo el mundo, cuyos datos están disponibles para todos los solicitantes, sin cargo.

Por el contrario, existe consenso internacional en contra de aplicar esta técnica (al menos en la actualidad) en la modificación de embriones humanos, debido a que la tecnología para la salud humana debe ser bien evaluada antes de ser transferida, mientras que para esta técnica, si bien es promisoría, las consecuencias aún son inciertas. A pesar de las restricciones bioéti-

cas establecidas, en 2018 la técnica CRISPR fue utilizada para el nacimiento de gemelas con su genoma editado en el estadio embrionario, para prevenir la infección por el virus del HIV que portaba su padre. Por haber transgredido las normas éticas internacionales, el científico a cargo fue condenado a prisión, aunque aún no hay evidencia clara de su éxito en la modificación del genoma de las gemelas.

Organismos Modificados Genéticamente (OMG)

Se denomina OMG a los organismos vivos, vegetales o animales, creados artificialmente en un laboratorio, mediante manipulación de sus genes. Presentan una o más alteraciones de su genoma original debido a la introducción de material genético y/o modificación del propio, con el principal objetivo de su **mejoramiento**. Éste último puede consistir en otorgar resistencia a plagas, a pesticidas o a condiciones climáticas extremas, aumentar el crecimiento y la producción de biomasa para su aprovechamiento en consumo humano, o favorecer la producción de un compuesto de interés biomédico. Pero a pesar de los potenciales beneficios que pueden ofrecer los OMG, se encuentran en discusión los **posibles efectos adversos** que puede tener la producción de este tipo de organismos sobre los individuos que los consumen, sobre el ecosistema y sobre la biodiversidad, ya que los genes introducidos o modificados podrían pasar descontroladamente de una especie a otra, desconociéndose el efecto que pueda tener este traspaso de material, y además atentando contra la biodiversidad. De hecho, en la naturaleza el paso de genes entre especies puede ocurrir, y los genes modificados podrían generar efectos desconocidos e indeseados en las especies receptoras.

En Argentina se regulan diversos aspectos previamente a comercializar un OMG: **1-** la producción de semillas y/o biomasa con materiales regulados; **2-** la experimentación y/o liberación de microorganismos y plantas al medio ambiente natural (evaluación de riesgo ambiental); **3-** los proyectos de experimentación y/o liberación de animales al medio natural; **4-** la actividad con vegetales en invernáculos de bioseguridad; **5-** la aptitud e inocuidad de los OMG desarrollados para alimentación. Antes de que un OMG llegue al mercado, debe ser evaluado según estos criterios para asegurar su inocuidad hacia el agroecosistema donde se lo liberará, y para la salud humana y animal. El producto derivado del OMG deberá ser equivalente a su homólogo convencional, no modificado genéticamente.

Una situación de utilización de un OMG que desde hace tiempo genera conflicto en Argentina es el uso de soja transgénica resistente al glifosato (*Roundup*), un herbicida de amplio espectro y muy efectivo, pero que según ciertos estudios afecta la salud de las comunidades agrícolas donde se utiliza. En la Universidad Nacional de Rosario se realizaron análisis estadísticos basados en encuestas, que arrojaron una tasa de patologías tiroideas en una proporción mucho más elevada en la zona agrícola estudiada (donde se utiliza el mencionado herbicida) que la tasa general de la población argentina, a lo que se agrega el reporte de distintos tipos de cáncer también en una tasa mayor que la media nacional. Estas estadísticas son apoyadas por

estudios *in vitro*, los cuales señalan que el glifosato afecta la supervivencia celular debido a la desregulación del ciclo celular y a cambios en su metabolismo.

Patentes

Años atrás surgieron diversas polémicas por el intento de patentamiento de genes cuya secuencia y función fue descrita a través de la investigación privada. Sin embargo, **los genes no son patentables**, ya que la información genética pertenece a quien la porta, y describir la secuencia y la función de un gen no implica ninguna invención por parte del investigador. Por el contrario, los genomas de los seres vivos ya existían naturalmente desde tiempo anterior a la secuenciación y caracterización de los mismos. Para solicitar el patentamiento de un producto debe cumplirse que el producto sea una **invención novedosa** y adecuada para su comercialización. Por ejemplo, sí es patentable el desarrollo de una técnica o un proceso para obtener determinado producto, como también pueden patentarse productos novedosos producidos a partir de microorganismos recombinantes o procesos fermentativos.

En Argentina se ha establecido el otorgamiento de patentes por aquellas “invenciones de productos o de procedimientos, siempre que sean nuevas, entrañen una actividad inventiva y sean susceptibles de aplicación industrial” (Ley de Patentes, N° 24.481). No obstante, las invenciones biotecnológicas no cuentan aún en nuestro país con una protección jurídica específica y sistemática, tema que aún permanece en agenda.

Clonación en animales: el problema de las mascotas

La clonación en animales comenzó a partir de un ingenioso experimento realizado por Hans Spemann en 1938, que demostró que los núcleos de los blastocitos mantienen la capacidad de promover el desarrollo de un organismo completo (Figura 7.1). La investigación original se amplió al implantar el núcleo de una célula completamente diferenciada en un óvulo hospedador, cuyo propio núcleo había sido eliminado, técnica hoy denominada **transferencia nuclear de células somáticas**. En 1952, Robert Briggs y Thomas King realizaron trasplantes nucleares en huevos enucleados (con su núcleo previamente extraído) de *Rana pipiens* para estudiar si los núcleos de las células embrionarias estaban diferenciados. A medida que el desarrollo progresaba desde el embrión al renacuajo y al adulto, observaron que la capacidad de los núcleos somáticos para desarrollar un adulto normal completo disminuía. Estos trasplantes nucleares más tarde se denominarían **clonación**.

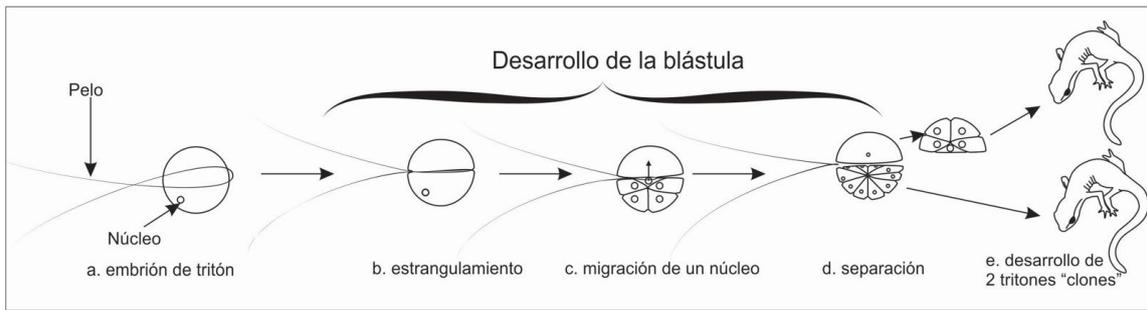


Figura 7.1. Experimento de trasplante nuclear. a- Cigoto de tritón; b- separación del cigoto en una mitad con un núcleo y la otra sin núcleo; c- en la etapa de 16 células se permitió el ingreso de un solo núcleo a la mitad anucleada; d- separación total de los embriones; e- después de 140 días, cada parte resultó en un tritón recién nacido completo y normal.

Los experimentos desarrollados posteriormente demostraron que los núcleos tomados de etapas avanzadas del desarrollo, en ocasiones son capaces de dirigir completamente un desarrollo normal después de la inyección en huevos enucleados, dando como resultado adultos fértiles, de forma esporádica. Luego de estos avances comenzó un período en el cual, a pesar de numerosos experimentos exitosos en plantas e invertebrados, resultó dificultoso un avance manipulando células diferenciadas en mamíferos. Posteriormente se descubrió que para el desarrollo normal de un mamífero es necesario que se expresen determinados genes del espermatozoide y que sus homólogos del óvulo se encuentren inactivos.

Luego de estos logros, acompañados concomitantemente por el progreso científico, comenzó a ponerse en boga el **clonado de mascotas** por parte de empresas privadas que piden sumas muy costosas a cambio de entregar una copia genética del perro o gato de compañía que desea "inmortalizar". Esta industria no tiene regulación y, a pesar de los altos costos, es muy exitosa y la demanda del servicio va en aumento. Sin embargo, lo que ofrecen las empresas es una réplica genética de la mascota pero no necesariamente tendrá el mismo comportamiento, el cual depende de las vivencias del animal original que se generaron a partir de la interacción genotipo-ambiente, es decir, bajo la influencia de un medio ambiente ocurrido en tiempo anterior. Esto se debe a que la conducta no se construye ciegamente desde un instructivo genético tal como si se instalara un programa en una computadora, sino que, como lo propone la etología, una de las explicaciones del comportamiento es la ontogenia. El comportamiento es el resultado de las interacciones de las potencialidades genéticas con el ambiente en contexto histórico, y el orden de las vivencias puede cambiar el resultado. Por lo tanto, el comportamiento de la réplica puede resultar en desazón para quienes han gastado tanto dinero.

Por otra parte, hay aquí algo también cuestionable: el humano reemplaza a ese ser que compartió un tiempo con él tal como reemplazaría a un objeto, perdiendo de vista lo que tenía de único que, justamente, era lo que importaba. ¿Lo quiere igual, sin historia, eternamente? Esto nos lleva incluso a un más amplio análisis simbólico: ¿acaso los seres (de cualquier tipo) que pasan por nuestra vida, no nos cambian? Se da así una paradoja: aún si el ser clonado fuera realmente igual al objeto del deseo, la relación ya no sería la misma porque el humano que desea tenerlo, ya no es el mismo.

Clonado de especies extintas

Los experimentos recientes y avances en genómica están reviviendo con gran fuerza la esperanza de practicar la transferencia nuclear en células somáticas para la "resurrección" de animales extintos, una sugerencia generada a partir del nacimiento de la oveja Dolly en 1996 y el anuncio en 1999 del proyecto de clonación del tilacino o tigre de Tasmania (*Thylacinus cy-nocephalus*) en Australia, que se basó en un espécimen de museo conservado en alcohol.

En el año 2009 se clonó con éxito a una de las subespecies extintas de cabra salvaje endémica de España, el bucardo (*Capra pyrenaica pyrenaica*) que había sido declarado extinto oficialmente en 2005. Para realizarlo, se utilizaron núcleos de fibroblastos de un ejemplar criopreservado y citoplasmas de ovocitos maduros recogidos de los oviductos de cabras domésticas superovuladas, enucleados y acoplados a los fibroblastos de bucardo por electrofusión. Los embriones reconstruidos se cultivaron y se transfirieron a cabras receptoras, íbex españolas o híbridos. Una cuestión a debatir es si el bucardo obtenido de este procedimiento es verdaderamente un bucardo, o si, por el hecho de provenir de una madre domesticada, ya no puede considerarse representativo de la especie silvestre original.

Otros proyectos también se encuentran en marcha, y de hecho algunas instituciones se ocupan de preservar muestras de tejido de animales en peligro de extinción, con el fin de recuperar las especies mediante clonado.

Este hecho demuestra que puede ser real en un futuro la utilización de la técnica de clonado para recuperar numerosas especies que en el presente se encuentran bajo peligro de desaparecer. Sin embargo, aunque este objetivo parece muy deseable para mantener la biodiversidad del planeta, también podría convertirse en un futuro en una estrategia de producción de animales para cotos de caza deportiva u otros objetivos que deberán estar sujetos a discusión desde el campo de la bioética.

Finalmente podemos agregar que la clonación de especies (incluidas las extintas) se ha posicionado hoy en el centro de un debate no solo biológico, sino filosófico, en el cual la viabilidad ya no es el centro de la discusión. Una discusión de este tema excede los límites de este texto, pero invitamos a la lectura de los numerosos trabajos que lo abarcan.

Clonación humana

En cuanto a la clonación humana, existe un fuerte debate al respecto. Se ha propuesto utilizar la clonación como estrategia terapéutica para cultivar células madre y desarrollar métodos de cura para enfermedades degenerativas. Sin embargo, muchos expertos opinan que crear clones humanos demuestra una carencia de respeto a la dignidad humana, principalmente por ignorar los derechos y los intereses de los individuos involucrados.

Mayor conflicto se nos presenta ante la idea de clonar un individuo para criarlo como un hijo (similar en algún sentido al clonado de mascotas), situación en la cual los resultados serían

imposibles de predecir. El debate demuestra que nuestros sistemas regulatorios no están en condiciones de visibilizar con claridad el problema.

Investigación genética en animales

En los últimos años se ha puesto énfasis en el bienestar de los animales que son objeto de una investigación, tanto si se trata de una población natural, que puede pertenecer o no a una especie en peligro de extinción, como si se trabaja con un grupo de animales de laboratorio. Algunas de las manipulaciones que estamos interesados en realizar emulan situaciones que el animal normalmente experimentaría, o que habrían sido experimentadas por sus ancestros evolutivos, y otras no. ¿Cuánta manipulación es justificable?

Hay cuatro fuentes de problemas éticos con los experimentos en animales:

- Temas de salud (sufrimiento en sentido amplio)
- Temas de conservación (interferencia con especies raras o interrupción del ecosistema local).
- Responsabilidad moral de tomar la vida en sí misma, sin tener en cuenta qué tan humano sea el método. Esta “santidad de la vida” es equivalente en humano a los derechos a la vida.
- Extrapolación a los animales de los derechos humanos a la libertad y la autodeterminación.

Este último punto es el que ahora está irrumpiendo con fuerza: ¿tienen derechos los animales no humanos?

Los estudiosos del tema han evaluado los beneficios científicos en términos de sufrimiento, interferencia ecológica e interferencia (tal vez terminal) en la vida del sujeto individual. Dado que la manipulación ambiental no debe ser altamente disruptiva o persistente, porque se puede afectar a algo más que la especie objeto, y los efectos pueden durar más allá de la partida del científico, se recomienda:

1. Realizar investigaciones piloto apropiadas para estimar efectos potenciales en el ambiente.
2. Monitorear los animales fuera del experimento, incluyendo especies que puedan ser afectadas por la manipulación.
3. Seguir estudios para estimar y minimizar la persistencia de manipulación luego del estudio.

Todo esto requiere un recorte ecosistémico y complejo: diseñar el trabajo teniendo en cuenta que lo que se va a estudiar es un nodo en una red, donde cualquier interferencia se expande y amplifica. Sin llegar a la supuesta postura budista de no caminar por temor a pisar a un ser, ni a la metáfora del “efecto mariposa”, sí es claro que operar desde este paradigma de pensamiento complejo que incluye nuestra responsabilidad respecto del ser y su ambiente, hace una mejor ciencia.

Otra intervención relevante en este contexto es la toma de muestras. Si bien el investigador en el laboratorio recibe la muestra como una parte ya no viva del ser, en algún lugar de la cadena, que debe estar pautado y normalizado para garantizar las características que permiten la generalización, hay un ser vivo sobre el que intervenimos. Consideramos entonces el modelo empleado en animales de laboratorio, **las 3 R: reemplazar, reducir y refinar**. De manera resumida, se trata de no usar animales cuando haya alternativas, por ejemplo restos, pelos, heces, simulaciones o cultivos. En caso de no existir una alternativa, se deberá diseñar la experiencia para reducir al mínimo el número de animales y refinar el procedimiento con vistas a suprimir, o reducir al mínimo, la intensidad y duración del sufrimiento. En una elección entre procedimientos, deben seleccionarse aquellos que usen el número mínimo de animales, causen el menor dolor, distrés o duración del daño, y que sean los que más probablemente produzcan resultados satisfactorios. El mejoramiento del bienestar de los animales, de laboratorio o de ambientes naturales, significa mejor ciencia, en la gran mayoría de los casos. Sin embargo, también hay conflictos.

Suponiendo (y habiendo demostrado) que no podemos reemplazar el uso de animales, las 3R se transforman en 2R. Pero reducción y refinamiento no son mutuamente independientes sino que pueden darse cuatro circunstancias: 1- Bienestar mejorado, pocos animales; 2- Bienestar comprometido, pocos animales; 3- Bienestar mejorado, muchos animales; 4- Bienestar comprometido, muchos animales.

De estas opciones, la 1 es la preferible, y la 4 es la que debe ser evitada. A muchos investigadores la 3 les parece más aceptable que la 2. Esto sugiere que el bienestar, o el evitamiento del dolor, sufrimiento y distrés, es más importante que el número de animales expuestos. En la dimensión de reducción, hay una ventana de número apropiado de animales por debajo y por encima de la cual el experimento se vuelve sin sentido o no ético. En el primer caso no se logran conclusiones por los pocos animales y, por lo tanto, el bajo poder estadístico; en el segundo, se es culpable de utilizar un grupo innecesariamente grande.

La dimensión de refinamiento es más directa: cuanto más refinamiento, mejor. Antes de la aparición de estas innovaciones conceptuales, ya algunas asociaciones científicas como la Animal Behavior Society (ABS) sugerían prácticas que entrarían en la noción de refinamiento: en sus lineamientos éticos sugiere que, cuando sea posible, los animales empleados en un estudio deben ser distribuidos a colegas para que sean empleados en otros estudios, asegurándose, por ejemplo, que los mismos animales no sean empleados repetidamente en cirugía. También indica que, a menos que esté prohibido por ley o cause daños a la población, los animales capturados con trampas deben ser liberados en su am-

biente. Este último punto, sin embargo, debe ser discutido cuidadosamente respecto del impacto que podría tener esta reintroducción.

La International Society for Applied Ethology (ISAE) propone unos lineamientos similares, de los cuales rescatamos aquí lo novedoso. Estos lineamientos fueron escritos en el entendimiento de que los animales pueden ser “usados” para el mejoramiento de las especies humanas o no humanas. Desde un punto de partida utilitarista, proponen que el uso de animales para propósitos científicos sólo es aceptable cuando el daño (físico o psicológico) provocado a los animales sea sobrepasado por los beneficios de la investigación. Los costos son estimados en términos del daño que podría ser experimentado por los animales utilizados, y los beneficios lo son en términos de las ganancias para los humanos, para otras especies animales o para el ambiente. La opción éticamente aceptable es aquella que provee más beneficios e involucra el menor daño.

Entonces, cuando planeamos un estudio, el objetivo no debe ser sólo reducir los daños hasta que sean menores que los beneficios, sino que los daños deben bajar lo más posible, y los beneficios maximizarse tanto como se pueda. Este balance daño-beneficio debe considerar cualquier distrés causado por el alojamiento (u otras influencias del experimentador) antes y después de la fase experimental de la investigación. Y enfatiza que todo investigador que usa animales nunca debe olvidar preguntarse: ¿puedo justificar el uso de animales en esta investigación?

En los últimos años, a raíz de las investigaciones sobre **bienestar animal**, está cambiando la visión que tenemos del animal de investigación. El reconocimiento de la **sentiencia** como adaptación, y de los estados de ánimo como relevantes en los seres vivos, cambia lo que podemos hacer con ellos y decir desde ellos. Por este motivo, una ciencia que al operar con animales incorpore los lineamientos bienestaristas y se dé a sí misma una estructura ética, no es la misma ciencia, sino que es una más “políticamente correcta”. Porque ahora sabemos que parte de nuestros resultados son por nuestra intervención, y parte por la alteración, en términos de bienestar animal y sentiencia, que hemos producido al ser intervenido. Otras son las preguntas y otros son los medios por los cuales definimos, de otra manera, a los seres.

En la actualidad, las investigaciones que impliquen la utilización de animales de laboratorio, especialmente cuando se trata de mamíferos, deben ser precedidas por la presentación del proyecto correspondiente para ser evaluado por un **Comité Institucional para el Cuidado de Animales de Laboratorio** (CICUAL). Dicho Comité debe ocuparse de evaluar las características del proyecto, el cual detallará la especie, el número de animales a utilizar, qué tratamientos se aplicarán y cuál será el método eutanásico, teniendo en cuenta los conceptos aquí mencionados anteriormente. A su vez, estos procedimientos y maniobras deberán ser realizados por una persona idónea, y toda la metodología deberá estar debidamente justificada.

Diversidad genética y ambientes naturales

El medio ambiente natural y las especies que lo habitan se encuentran en muchos casos amenazados por diversos intereses de los poderes políticos y económicos en distintos puntos del planeta, contrariamente a la necesidad de aunar esfuerzos para su conservación. Es responsabilidad de todos, pero principalmente de las autoridades gubernamentales, la comprensión de esta problemática y la acción en favor de una **bioética ambiental**.

En América del Sur, el tratado inicial del MERCOSUR dejó planteado el compromiso de los Estados Partes de armonizar sus legislaciones para establecer la consolidación de una política única en materia ambiental, de acceso a recursos genéticos, y de otros temas vinculantes. Los países miembros suscriben a un Acuerdo Marco sobre Medio Ambiente del MERCOSUR (2001) en referencia a la diversidad biológica, lo que involucra directamente a los recursos genéticos. La importancia que reviste la diversidad biológica y genética en los países de América del Sur es de carácter común, por lo tanto, su conservación es un compromiso regional y colectivo debido a que la Naturaleza no se limita a barreras políticas ni territoriales. Es importante aclarar que más allá de este común acuerdo, cada país miembro legisla con autonomía los alcances de sus incumbencias y, al igual que con otras temáticas de importancia nacional, deben ser reguladas por leyes y decretos.

Cuestionario

Responder las siguientes preguntas:

- 1- ¿Cómo deben manejarse las muestras de individuos que participan en un estudio poblacional? 2- ¿Y si se trata de muestras para un diagnóstico individual, cómo debe procederse respecto de la identidad de la muestra y sus resultados?
- 3- ¿Qué consecuencias discutibles desde el punto de vista ético puede traer la clonación de especies animales?
- 4- ¿Qué significa el principio de las 3R en relación con el estudio de especies animales?

Referencias

Abellán, D. F. (2006). *Aspectos bioéticos y legales del diagnóstico genético*. Revista de la Escuela de Medicina Legal, pp. 14–26.

Banco Nacional de Datos Genéticos. En: Argentina.gob.ar
<https://www.argentina.gob.ar/ciencia/bndg/historia>

- Bianchi, N. O. (2007). *Aspectos éticos y legales de la genética humana en Argentina. Estudios en poblaciones humanas*. Editorial De Los Cuatro Vientos. Buenos Aires.
- Brena Sesma, I. (2008). Privacidad y confidencialidad de los datos genéticos. *Boletín mexicano de derecho comparado*, pp. 109-125
- Briggs, R. y King, T. J. (1952). Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 38, 455–463. <https://doi.org/10.1073/pnas.38.5.455>
- Burn J. y Watson M. (2016). The Human Variome Project. *Hum Mutat* 37(6): 505-507.
- Campbell, K. H. S., McWhir, J., Ritchie, W. A. y Wilmut, I. (1996). Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 380, 64–66.
- Cyranoski, D. (2019). *What's next for CRISPR babies?* *Nature*, v.566: 440-44.
- de Pomerai, D. (1998). *Dolly mixtures: retrospect and prospects for animal and human cloning. Human reproduction and genetic ethics*, 4, 39–48. <https://doi.org/10.1179/hrge.4.2.74k00q78738822w3>
- Fernández, M., Grau, C. y Trigo P. (2012). Impacto de la enfermedad de Huntington en la familia. *An. Sist. Sanit. Navar*, 35 (2), 295-307.
- Folch, J., Cocero, M. J., Chesné, P., Alabart, J. L., Domínguez, V., Cognié, Y., Roche, A., Fernández-Árias, A., Martí, J. I., Sánchez, P., Echegoyen, E., Beckers, J. F., Bonastre, A. S. y Vignon, X. (2009). First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. *Theriogenology*, 71, 1026–1034. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.11.005>
- Gurdon, J. B. (1962). Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Developmental Biology*, 4, 256–273. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(62\)90043-X](https://doi.org/10.1016/0012-1606(62)90043-X)
- Gurdon, J. B. y Laskey, R. A. (1970). The transplantation of nuclei from single cultured cells into enucleate frogs' eggs. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 24, 227–248.
- Gurdon, J. B., Laskey, R. A. y Reeves, O. R. (1975). The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cells of adult frogs. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 34, 93–112.
- Gurdon, J. B. y Uehlinger, V. (1966). "Fertile" intestine nuclei. *Nature*, 210, 1240–1241. <https://doi.org/10.1038/2101240a0>
- Hanson, M. S. (2001). A Commentary on the Past, Present, and Future of Cloning. *Bios*, 72, 21–24.
- Hewson C.J. (2003). What is animal welfare? Common definitions and their practical consequences. *Can Vet J*; 44(6), 496–499.
- Jeffreys, A. J., Wilson V. y Thein S. L. (1983). Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature*, 314, 67-73.
- Lahitte, H. B. (1994). *De la antropología cognitiva a la ecología biocultural*. Editorial Lahitte, H. B. L.O.L.A. (Literature of Latin America), Buenos Aires, Argentina ISBN-10: 9509725242 ISBN-13: 978-9509725249.

- Lamm, E. (2017). Prácticas prohibidas: alteración genética. *Diccionario Enciclopédico de la Legislación Sanitaria Argentina (DELS)*. <http://www.salud.gob.ar/dels/entradas/practicas-prohibidas-alteracion-genetica>
- Madariaga A. Editor (2008). Las abuelas y la genética. El aporte de la ciencia en la búsqueda de los chicos desaparecidos. Editorial Abuelas de Plaza de Mayo. 205 pág.
- Martínez Picabea de Giorgiutti, E. (2011). *Entre la naturaleza y la cultura*. Segunda parte. Editorial Dunken, Buenos Aires.
- Mellor, D. J. (2016). Updating animal welfare thinking: Moving beyond the “Five Freedoms” towards “a Life Worth Living”. *Animals*, 6, 21-41.
- Moya, G. (2012). *Diagnóstico prenatal en el marco de la bioética personalista ontológica: percepción del uso, actitudes y requerimientos de los pacientes en un centro privado de la ciudad de Buenos Aires*. *Vida y Ética*, 2, 23–86.
- Ortiz A. (2017). Los efectos del herbicida glifosato en Argentina: "¿Cuánto crecimiento del PIB justifica el cáncer?" *eldiario.es* (6/mar/2017): https://www.eldiario.es/desalambre/efectos-glifosato-argentina_1_3552371.html
- Pellegrini, P. A. (2013). Transgénicos: ciencia, agricultura y controversias en la Argentina. 1ra. edición. *Editorial Universidad Nacional de Quilmes*, Bernal, 363 pág.
- Piña-Aguilar, R. E., Lopez-Saucedo, J., Sheffield, R., Ruiz-Galaz, L. I., De J. Barroso-Padilla, J. y Gutiérrez-Gutiérrez, A. (2009). Revival of extinct species using nuclear transfer: Hope for the mammoth, true for the pyrenean ibex, but is it time for “conservation cloning”? *Cloning and Stem Cells*, 11, 341–346.
- Simón J. E., Rodríguez A. S. y Vispo N. S. (2018). CRISPR-Cas9: A Precise Approach to Genome Engineering. *Therapeutic Innovation & Regulatory Science*, 52(6), 1-7.
- Spemann, H., 1938. *Embryonic Development and Induction*. Yale University Press, New Haven, Conn (reprinted by Hafner publishing company, 1962).
- Wertz, D. C., Fletcher, J. C. y Berg, K. (2003). Review of Ethical Issues in Medical Genetics. Report of Consultants to WHO. *World Health Organization Human Genetics Programme*: www.who.int.

CAPÍTULO 8

Protocolos de trabajo de laboratorio

*Alejandro del Palacio, Cecilia I. Catanesi
y Lucas González García*

*“Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es
también un niño colocado ante fenómenos naturales que le
impresionan como un cuento de hadas”*

Maria Salomea Skłodowska-Curie

En esta sección se presentan prácticas de laboratorio, utilizadas en relación al enfoque y materiales que los docentes dispongan. Los mismos pueden adaptarse e incrementarse dependiendo de las variables antes mencionadas. Se incluyen aquí, protocolos para diferentes actividades que ofrecen al estudiantado la posibilidad de familiarizarse con el trabajo en distintas áreas de Genética.

El recorrido comienza con la cría y el mantenimiento de líneas mutantes de *Drosophila melanogaster*, los cruzamientos y el análisis de los resultados obtenidos. También con las mismas líneas de moscas, a partir de larvas, se preparan las muestras para la observación de cromosomas politénicos. Del mismo modo se presenta la extracción de ácido desoxirribonucleico a partir de muestras de diferente origen, y su evaluación a través de electroforesis en geles de agarosa. Posteriormente este material volverá a utilizarse en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), conociendo los diferentes requerimientos y etapas del proceso.

***Drosophila melanogaster* como modelo de estudio**

Drosophila melanogaster (Figura 8.1) también llamada vulgarmente mosca del vinagre o mosca de la fruta, es una especie de díptero de la familia Drosophilidae que recibe su nombre debido a que se alimenta de frutas en proceso de fermentación tales como manzanas, bananas, uvas, etc.

Esta especie es muy conveniente como modelo de estudio. En primer lugar, es fácil de criar, requiere poco espacio y no demanda altos costos para su mantenimiento como sucede, por ejemplo, para líneas de roedores u otros modelos animales. En segundo lugar, su ciclo de vida dura sólo de 9 a 10 días y muestra una clara distinción entre fases. Además, aporta una descendencia numerosa en cada ciclo reproductivo.

Fue adoptada como animal para la experimentación genética por Thomas Morgan a principios del siglo XX. En el año 2000 la compañía Celera Genomics junto al consorcio público, describieron su genoma completo; éste contiene alrededor de 165 Mb (1 Mb = 1 millón de pares de bases) que conforman 13.600 genes; su número cromosómico es bajo, sólo cuatro pares de cromosomas, incluido el par sexual. Y algo muy particular, es que en las glándulas salivales de las larvas se encuentran cromosomas gigantes (politénicos) que son útiles para estudios citogenéticos. Hoy en día se cuenta con una gran cantidad de líneas mutantes que producen fenotipos claramente observables.

Una de las principales características que los convierten en organismo modelo es la similitud entre el funcionamiento de su genoma y el de nuestra especie: el 75% de los genes asociados con enfermedades genéticas o cáncer en humanos tienen su contraparte en el genoma de la mosca. Esa similitud muestra que los mecanismos biológicos básicos que provienen de lejanos ancestros se han conservado a lo largo de la línea evolutiva de ambas especies, y resalta la aptitud de la mosca como modelo para estudiar genes asociados con enfermedades neurológicas, neurodegenerativas, proliferación celular cancerosa, enfermedades cardiovasculares, estrés oxidativo, desórdenes metabólicos, diabetes y envejecimiento. Recientemente se ha visto que los genes *Hox* conocidos en la mosca también se encuentran en los humanos, y se ha podido demostrar que las moscas deficientes en un gen *Hox* a las que se inserta el gen *Hox* humano recuperan la función perdida. Esto es importante porque algunas malformaciones congénitas en humanos están relacionadas con mutaciones en los genes *Hox*, y gracias a los estudios desarrollados con *Drosophila* se conocen mucho mejor las causas de dichas malformaciones.

Por todas estas razones, *Drosophila melanogaster* es un organismo modelo muy estudiado, ya que permite entender fenómenos biológicos particulares con facilidad y extrapolar estos conocimientos a otras especies como por ejemplo a la especie humana.

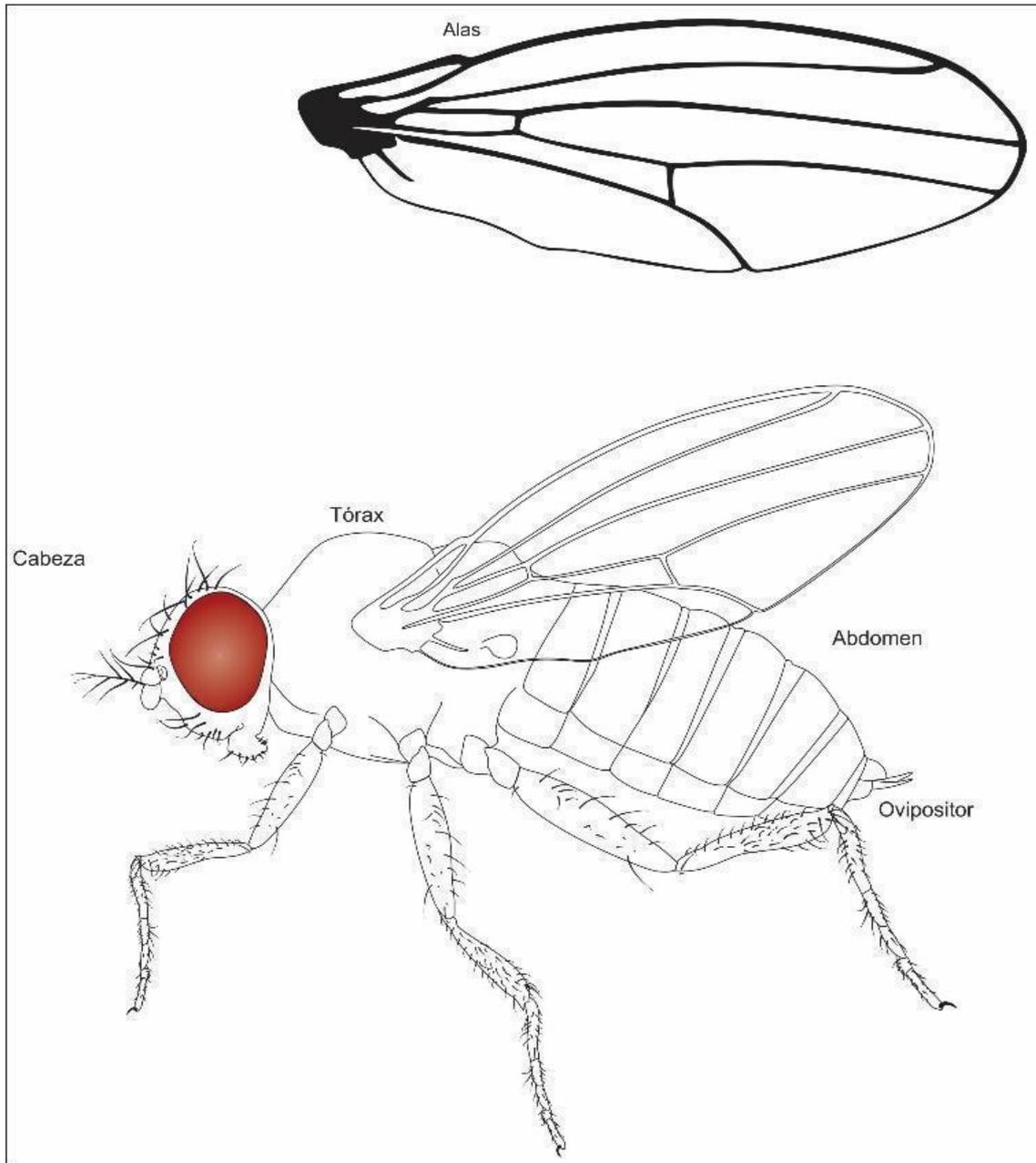


Figura 8.1. *Drosophila melanogaster*.

Ciclo de vida

Normalmente el desarrollo embrionario demora sólo un día, luego del cual eclosiona del huevo una larva de primer estadio que presenta dos linajes celulares distintos: larvario e imagal. Las células larvales, diferenciadas, forman el cuerpo de la larva y son poliploides; y las células imagales, indiferenciadas, forman los discos imagales en número de nueve pares y un disco impar, son pequeñas, diploides, y van a diferenciarse cuando la larva entra en metamorfosis, desarrollando la **cabeza** (discos labiales, clipeolabiales y ojo-antenas), el **tórax** (discos humerales, alares y halteriales) y el **abdomen** (disco genital).

La duración de su ciclo de vida depende de varios factores ambientales, como la temperatura y la humedad. A una temperatura de 25 °C y una humedad relativa del 60 %, el ciclo de la *Drosophila melanogaster* desde huevo a adulto dura aproximadamente 10 días, pero cuando la temperatura se disminuye a 20, 15 y 10 °C la cantidad de días aumenta a 15, 25 y 70 días respectivamente, lo cual le confiere gran plasticidad para el manejo en laboratorio.

En un ciclo bajo condiciones de 25 °C, la primera y segunda muda se producen en la larva cada 24 horas, mientras que la tercera lo hace 48 horas después, fácilmente diferenciable ya que emerge del medio y comienza a desplazarse sobre las paredes del recipiente para finalmente formar el **pupario**. La metamorfosis comienza en este momento, demorando 3-5 días en los cuales las estructuras del imago son conformadas por los anteriormente mencionados **discos imagales** y las células (ahora diferenciadas) larvales. Finalmente emerge el imago del pupario, y durante las primeras horas de vida comienza el endurecimiento de la cutícula (con la aparición de la pigmentación característica de la especie), se produce el endurecimiento y extensión de las alas, para finalmente llegar a la madurez sexual a partir de las 8 hs luego de la emergencia (dependiente del sexo).

Las moscas maduras producen una “canción de cortejo” generada por los machos mediante la vibración de sus alas, las parejas se aparean, y se produce la fertilización mediante el ingreso de los espermatozoides al huevo a través del micrópilo, para finalmente ser almacenados en la **espermateca** de la hembra. (Figura 8.2)

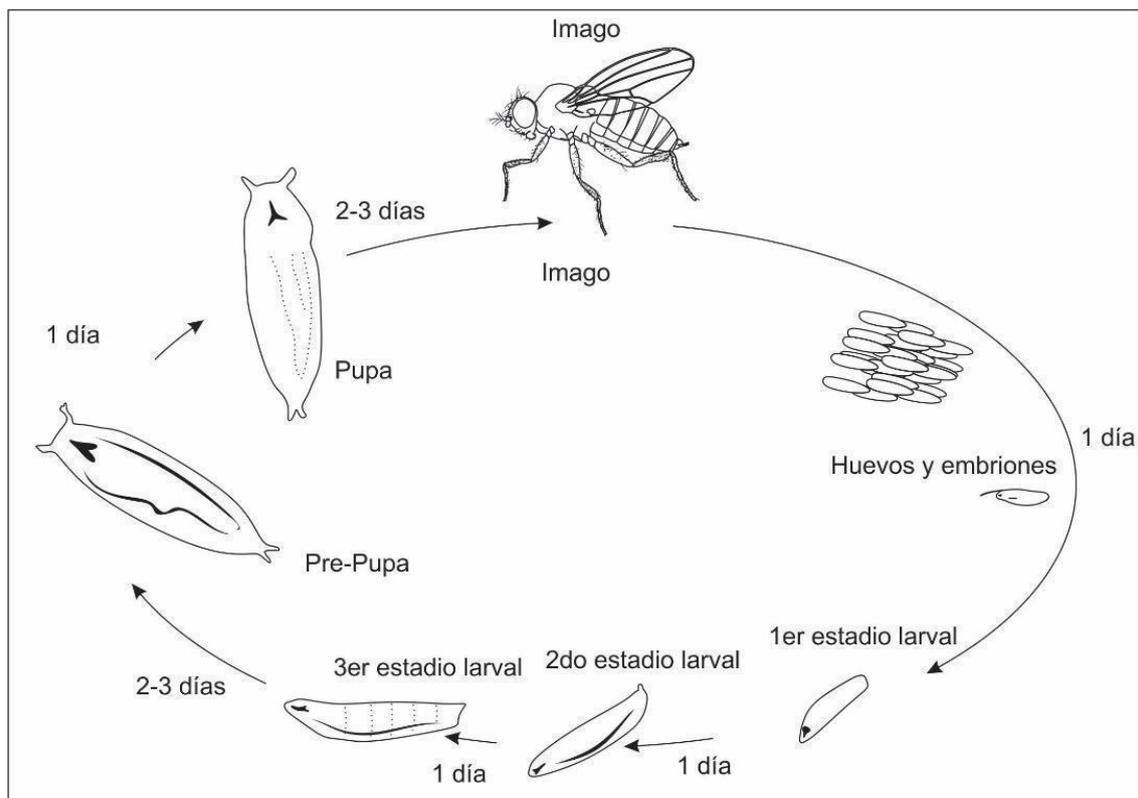


Figura 8.2. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.

Medio de cultivo y técnica de observación

Para poder investigar a estos organismos se requiere de un medio de cultivo apropiado. Éste, debe contener cantidad de azúcar que permita el crecimiento de las levaduras, principal alimento de las larvas por su alto contenido de proteínas. Además, debe contar con consistencia apropiada a partir de la mezcla de agar agar o carragenina combinada con harina de maíz, que se utiliza como fuente de hidratos de carbono. El medio debe poseer también elementos conservantes para inhibir el crecimiento de hongos y bacterias que contaminan o retardan el desarrollo de las moscas, como el metilparabeno (conocido comercialmente como Nipagín). Por último, pero no menos importante es una cantidad suficiente de agua, ya que la causa más habitual de muerte de los individuos es la desecación.

Para el manejo de las moscas en el laboratorio se requieren los siguientes materiales:

- Microscopio estereoscópico
- Pincel de cerdas suaves y punta redondeada. Pinzas
- Eterizador.
- Éter etílico y pipetas de plástico de 3ml.
- Frasco “Morgue” para la eliminación de individuos, con una mezcla de compuestos que permiten esta tarea (por ejemplo aceite y éter al 70%)
- Frascos o tubos homeopáticos conteniendo el medio de cultivo y tapones que no sean impermeables (por ejemplo de algodón y gasa), para permitir el aireado del cultivo, y marcador indeleble.

Antes de comenzar se debe realizar una higienización de todo el instrumental, mesadas y material óptico con etanol al 70%.

Las moscas deben inmovilizarse para su observación bajo lupa. Para este fin, se han desarrollado una variedad de métodos para anestesiarse moscas; entre los más utilizados se incluyen **éter**, marcas comerciales (por ejemplo *Flynap*®), dióxido de carbono y enfriamiento.

El éter es inflamable, tiene un olor fuerte y matará a las moscas si están demasiado tiempo expuestas al gas pero debido a sus bajos requerimientos técnicos y económicos será la metodología más frecuentemente utilizada durante las experiencias en el laboratorio. Con este fin es necesario utilizar el eterizador, en el cual se introducirán las moscas y mediante unas gotas de éter se dormirán (no olvidar tener cuidado al dar vuelta el vial con las moscas, y para asegurar la introducción de la mayoría se debe golpear cuidadosamente el mismo). Luego de 15-30 segundos observar las moscas bajo lupa, para finalmente incluir las moscas deseadas para cada cruce en nuevos viales (para evitar que se peguen al medio las moscas se deben depositar sobre un vial en posición horizontal hasta que se despierten).

Recordar que es de suma importancia etiquetar los nuevos viales con el sexo, cantidad y fenotipo de las moscas introducidas, y la fecha. Finalmente descartar en caso de ser necesario los adultos restantes.

Dimorfismo sexual y obtención de hembras vírgenes

Al realizar cruces, es necesario **reconocer el sexo** de los individuos, para lo cual se aprovecha el dimorfismo sexual que presenta esta especie (Figura 8.3). En general, los adultos miden entre 2 y 3 mm de largo, siendo las hembras de mayor tamaño. El macho tiene los tres segmentos finales del **abdomen** fusionados y muy pigmentados, mientras que en la hembra estos segmentos no se muestran fusionados y su coloración es más clara que en el macho, además de presentar su parte terminal en forma puntiaguda, mientras que en el macho el abdomen termina en forma redondeada.

En algunos casos la coloración de macho y hembra no resulta tan clara, como es el caso cuando los individuos recién emergen del pupario y aún no han adquirido su coloración definitiva. También pueden presentarse algunas mutaciones que aumentan o disminuyen el grado de melanización de las moscas, haciendo más difícil el reconocimiento del patrón típico de pigmentación. En estos casos es de utilidad observar una serie de cerdas cortas presentes en el tarso del par de patas anteriores del macho, denominada **peine sexual**, estructura que está ausente en las hembras.

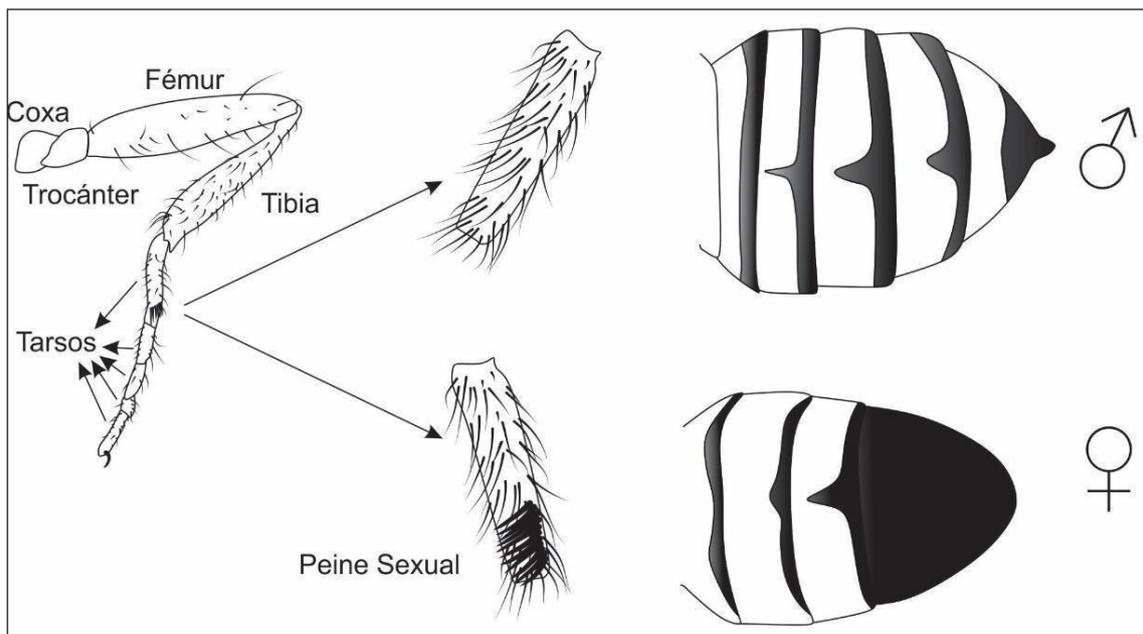


Figura 8.3. Dimorfismo sexual de *Drosophila melanogaster*.

Para estudiar los patrones de herencia mediante cruces experimentales de *Drosophila*, es muy importante que las hembras con el genotipo de interés sean vírgenes, debido a su capacidad de producir descendencia utilizando el esperma almacenado, por lo cual es preciso evitar las hembras no vírgenes para lograr éxito al planear los cruces.

Los machos maduran sexualmente aproximadamente 6 horas después de emerger del pupario mientras que las hembras aproximadamente 8-10 horas después de haber emergido. Esta diferencia en la maduración sexual permite que la separación durante las primeras 8 horas

luego de la emergencia brinde las hembras vírgenes necesarias para los experimentos. Alternativamente en las primeras horas después de la eclosión, se puede observar una mancha verdosa oscura que corresponde al meconio (los restos de su última comida antes de pupar) en la parte inferior del abdomen lo cual es de gran utilidad si por alguna razón no se pudo controlar de manera rigurosa el tiempo de emergencia.

Es necesario contar con una buena diagnosis de los sexos para poder asegurar la correcta asignación a cada individuo y, de esta manera, optimizar los tiempos de esta ardua tarea.

Extracción y Purificación de ADN

En la actualidad, el estudio de la variación genética entre individuos, poblaciones y especies para explicar patrones y procesos ecológico-evolutivos se aborda mediante marcadores moleculares que permiten distinguir individuos, para lo cual es necesario aislar las moléculas de ADN del genoma de los individuos a estudiar.

Los nucleótidos que componen la molécula de ADN poseen grupos fosfato que le confieren una carga negativa y lo hacen altamente polar, por lo cual el ADN puede disolverse en solución acuosa y formar una capa hidratante a su alrededor. Esto permite la purificación del ADN separándolo de las proteínas presentes en la célula, mediante el uso de moléculas con carga positiva, o utilizando resinas inorgánicas a las cuales el ADN se une.

La posibilidad de almacenar ADN purificado por tiempo indefinido dependerá de la calidad de la extracción, pues la estructura de la molécula puede alterarse si quedan otros componentes (proteínas o reactivos de extracción) en la solución, lo cual afectará la durabilidad y la posibilidad de reproducir experimentos. La cantidad de ADN extraído va a depender de la muestra de la cual se parte, siendo fundamental entre otros factores el número y estado de las células del tejido que se muestrea. De acuerdo con Sambrook (2001) y como regla general, un buen método de extracción debe resultar en una alta pureza y concentración del ADN a fin de mantener su integridad física y bioquímica.

El tipo de tejido que se utilice como fuente de ADN va a definir la técnica de extracción y la pureza y concentración del material obtenido. Por ejemplo, la metodología para obtener ADN de las hojas de un vegetal es diferente al método empleado para obtenerlo de las semillas. También debe considerarse que la cantidad y la calidad del ADN obtenido determinarán qué técnicas de análisis genético podrán realizarse posteriormente (RFLP, RAPD, AFLP, secuenciación, etc.).

En términos generales, la extracción de ADN consta de 3 etapas: colecta del material, extracción y purificación del ADN (Figura 8.4).

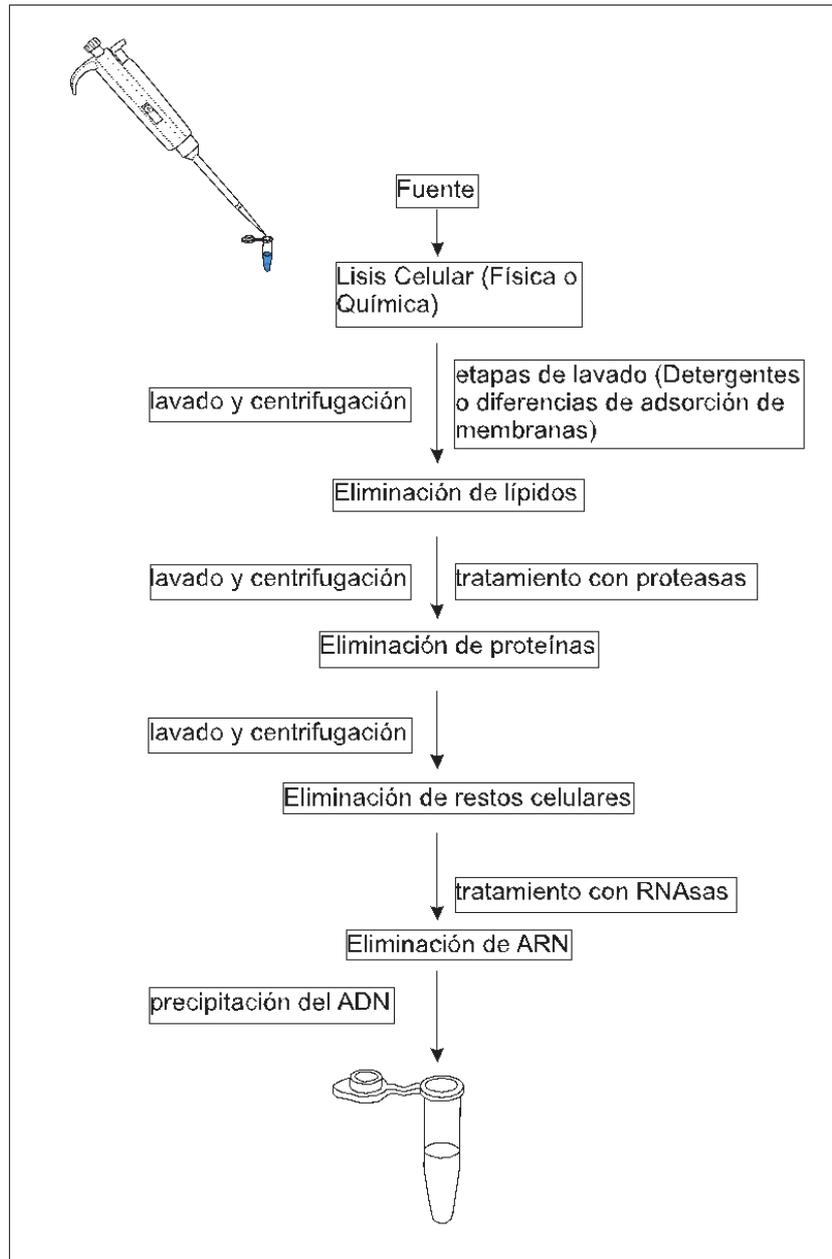


Figura 8.4. Pasos de la extracción y purificación de ADN

Colecta del Material

La obtención, transporte y almacenamiento del material es específica del grupo a estudiar y debe ser debidamente investigado previamente, ya que un error en esta etapa reduce drásticamente la viabilidad de la muestra. En la Tabla 8.1 se muestran de manera general las recomendaciones para los tipos de tejidos más utilizados.

Tabla 8.1. Colecta, transporte y almacenamiento de muestras vegetales y animales

Organismo	Colecta en campo/transporte de la muestra	Almacenamiento de la muestra previo a la extracción
Plantas	Es recomendable colectar tejido joven (contiene más células por unidad de peso que el tejido viejo y menos polisacáridos y polifenoles que dificultan la extracción). Debe congelarse lo antes posible en nitrógeno líquido (evita formación de cristales y síntesis de metabolitos secundarios post-abscisión). Para tejido obtenido de invernadero o cultivo in vitro, no es necesario congelar el material, puede hacerse la extracción directamente.	Almacenar el tejido a -80 °C y evitar ciclos de congelación/descongelación. Se recomienda separar la muestra en varios paquetes pequeños con la cantidad de material a procesar. Alternativamente, el tejido puede ser liofilizado y almacenado a temperatura ambiente entre 15 y 25 °C, aunque esta alternativa no es viable para suculentas.
Animales	<p>Tejido</p> <p>Cortar en pedazos pequeños (aproximadamente 0,5x0,5 cm o menores) para facilitar su maceración posterior. El tejido puede deshidratarse con etanol 100% o congelarse con nitrógeno líquido. Para el transporte debe inactivarse la acción de las endonucleasas mediante un buffer (ej. RNAlater) u homogeneizar el tejido en buffer de lisis que contenga sales de guanidina o β-mercaptoetanol, que inhiben las nucleasas.</p>	Las muestras deben almacenarse de acuerdo con el método de colecta utilizado, en etanol a 4 °C o si fue congelado con nitrógeno líquido a -80 °C.
	<p>Sangre</p> <p>Utilizar agujas de calibre apropiado, respetar la relación muestra/anticoagulante. Homogeneizar la muestra para evitar la hemólisis (la hemoglobina inhibe las reacciones enzimáticas posteriores) la coagulación (la fibrina es insoluble, e impide una lisis apropiada por su capacidad de entrelazarse y atrapar entre sus fibras proteínas, agua y células) y la contaminación bacteriana. Es importante evitar movimientos bruscos durante el transporte.</p>	Las muestras pueden mantenerse por unas horas a 4 °C después de su colecta. Si se congela a -20 °C, debe descongelarse a temperatura ambiente y procesarse en su totalidad, por lo cual es aconsejable hacer alícuotas.

Fuente: modificado de Velázquez Alejos, Aragón Martínez y Romero (2008).

Extracción de ADN

A excepción de unos pocos tipos celulares, podemos extraer ADN de cualquier tejido o rastro biológico de los diferentes organismos. La primera etapa es la **homogeneización** de la muestra, que puede ser mecánica o química y consiste en romper las uniones entre las células. Esta homogeneización facilita a continuación, la interacción con las soluciones de lisis que producen ruptura de la membrana plasmática celular, liberando el material genético. Siguiendo los pasos propuestos por Rocha-Salavarieta (2002) podemos dividir el proceso en 3 pasos generales:

- I. **Ruptura de tejidos y paredes celulares.** Para disgregar tejidos blandos puede realizarse una incubación con proteasa durante 16 horas (incubación *overnight*) a 37° C. Si se trata de material vegetal, por ejemplo semillas, generalmente se utiliza nitrógeno líquido o hielo seco y acción mecánica, y luego puede realizarse una digestión de las paredes celulares utilizando enzimas de tipo celulasa. Las muestras de sangre, saliva u otros fluidos no requieren de este paso.
- II. **Ruptura de membranas.** El paso siguiente es la ruptura de las membranas celulares para liberar el ADN, mediante un buffer de lisis que contiene detergentes como el dodecil sulfato sódico (SDS) o el tritón X-100, que ejercen su acción sobre los lípidos de membrana. Alternativamente, en caso de disponer de un equipo de sonicación, puede aplicarse ultrasonido como método físico de ruptura.
- III. Luego de esta etapa se centrifuga la muestra para separar el material genético de los componentes celulares no solubles.
- IV. **Inhibición de enzimas nucleasas.** En general toda célula contiene nucleasas que destruyen los ácidos nucleicos (ADNasas y también ARNasas) las cuales rápidamente deben ser inactivadas para evitar la destrucción del material genético de la muestra. Como las nucleasas son proteínas, su inactivación se realiza con métodos que promueven la lisis proteica sin afectar a los ácidos nucleicos. Generalmente se utiliza proteinasa K y posterior tratamiento con solventes orgánicos (fenol y cloroformo) y/o antioxidantes (dithiothreitol y β -mercaptoetanol).

El objetivo de extraer ADN es obtener preparaciones altamente enriquecidas en este ácido nucleico y libres de otras moléculas, entre las cuales se encuentran los propios reactivos utilizados en el proceso de extracción (Tabla 8.2). Opcionalmente, la muestra puede tratarse con enzima ARNasa que degrada específicamente las moléculas de ARN presentes en la muestra; en tal caso esto debe realizarse mediante una incubación con ARNasa previa a la lisis con proteinasa K.

Precipitación y cuantificación del ADN

Una vez eliminado todo tipo de moléculas lipídicas y proteicas, se agrega etanol a la suspensión que contiene el ADN, pudiendo suplementarse con acetato de sodio o acetato de amonio, dado que estas sales interactúan con los grupos fosfato. Estos componentes hacen que la molécula de ADN, normalmente hidrofílica, se pliegue sobre sí y se vuelva más insoluble, precipitando con facilidad mediante centrifugado. El pellet obtenido se “enjuaga” con etanol 70% y luego de descartar el alcohol, se resuspende el ADN en distintos medios, como agua o buffer tris-EDTA para su conservación.

Previamente a utilizar la muestra de ADN en análisis genéticos, es importante determinar el rendimiento obtenido, para lo cual existen diversos métodos de estimación de la **concentración** de los ácidos nucleicos en una preparación. Dado que las bases nitrogenadas del ADN absorben luz ultravioleta (UV) a 260 nanómetros (nm), pueden realizarse mediciones mediante espectrofotometría.

Otra estrategia posible es la separación del material genético por electroforesis (ver protocolo de electroforesis más abajo) y medir la intensidad de fluorescencia emitida por un compuesto intercalante que se une al ADN. Existen diversos intercalantes que tiñen las moléculas de ADN, entre ellos el bromuro de etidio se encuentra en desuso por su alto potencial cancerígeno, y en su reemplazo, se comercializan agentes intercalantes menos agresivos, como por ejemplo GelRed®. La concentración de la muestra en la corrida electroforética se mide por comparación con una muestra control de la cual se conozca previamente la concentración y cantidad sembrada. A su vez, la técnica de electroforesis también permite comprobar la **integridad de las moléculas** de ADN, pudiendo observarse si el mismo se encuentra degradado en fragmentos pequeños o como molécula íntegra (fragmentos de gran tamaño).

Tabla 8.2. Reactivos utilizados en la extracción y purificación de ADN

Reactivo	Característica	Función
Tris (hidroximetil amino metano)	Tampón biológico	Estabiliza el pH de la solución (entre 7,0 y 8,0)
EDTA (ácido etilendiamintetracético)	Agente quelante	Atrapa los iones magnesio presentes en el medio para evitar la acción de enzimas que degradan al ADN.
Cloruro de sodio.	Sal	A altas concentraciones solubiliza al ADN.
Cloruro de potasio	Sal	Equilibra fuerzas iónicas.
Acetato de sodio	Sal	Precipita al ADN.
Acetato de potasio	Sal	Precipita proteínas.
Fenol	Solvente orgánico (tóxico)	Desnaturaliza proteínas.

Cloroformo	Solvente orgánico (tóxico)	Desnaturaliza proteínas. Remueve lípidos. Solubiliza al fenol y lo elimina de la solución.
SDS (dodecil sulfato de sodio)	Detergente aniónico	Solubiliza proteínas y membranas.
Sarkosyl (lauril sarcosina)	Detergente aniónico	Inhibe hexoquinasas. Solubiliza proteínas y membranas.
CTAB (hexadecil trimetil bromuro de amonio)	Detergente catiónico	Solubiliza polisacáridos.
Triton X-100	Detergente	Solubiliza proteínas y membranas.
β-Mercaptoetanol	Antioxidante	Inactiva proteínas por reducción de los puentes disulfuro.
DTI (dithiothreitol)	Antioxidante	Reduce los grupos sulfuro de las proteínas.
Octanol isoamilalcohol	Alcoholes	Agente antioxidante.
PVP (polivinil pirrolidona)	Detergente	Elimina compuestos fenólicos que tienden a inhibir la actividad de enzimas. Precipita ácidos nucleicos.
Etanol	Alcohol	Precipita ácidos nucleicos
Isopropanol	Alcohol	Precipita ácidos nucleicos

Fuente: modificado de Sambrook, Fritsch, y Maniatis (1989).

Protocolos de Laboratorio

A continuación se presentan dos protocolos a desarrollar en los trabajos de laboratorio. Debe tenerse en cuenta que las mesadas de trabajo, antes de comenzar con el método de extracción elegido, deben repasarse con hipoclorito de sodio al 10%. Por otra parte, todo el material que se desecha de los métodos de extracción debe descartarse adecuadamente y por el método validado según las normas vigentes.

Método 1: purificación de ADN por técnica de salting-out

Esta técnica es de utilidad para aislar ADN a partir de fluidos corporales como sangre (linfocitos) o saliva (células de exfoliación bucal), y se basa en el trabajo de Miller y colaboradores (1988). Para realizarla, un docente voluntario se hará un enjuague bucal con 1 ml de agua destilada o agua mineral, y luego de un buche enérgico lo recolectará en un tubo de polipropileno de 15 ml (es importante que el voluntario no haya comido ni bebido infusiones durante la última media hora).

- Equilibrar los volúmenes en tubos de 15ml y centrifugar a 4.000 rpm 10 minutos con refrigeración.
- Descartar el sobrenadante y resuspender las células en 300 ul de Buffer de Digestión con 5ul de Proteinasa K (10mg/ml). Incubar *over night* (O.N.=16 horas) a 37 °C.
- Inactivar la Proteinasa K, hirviendo la muestra durante 5 minutos
- Luego de la incubación, agregar un volumen de acetato de amonio a concentración final 2,5 M (aproximadamente 100ul a cada muestra). Mezclar por inversión varias veces
- Centrifugar a 12.000 rpm por 8 minutos para precipitar las proteínas
- Transferir el sobrenadante a otro tubo y descartar el precipitado
- Agregar igual volumen de Isopropanol para deshidratar y precipitar el ADN, agitar por inversión.
- Centrifugar a 14.000 rpm por 20 min, descartar el sobrenadante.
- Lavar con 1 ml de etanol 70% y centrifugar a 14.000 rpm por 5 min
- Descartar el sobrenadante, secar a T° ambiente durante 5 a 10 minutos (o a 37 °C, por 5 minutos).
- Resuspender en 100 ul de H₂O bidestilada para rehidratar la muestra.
- Homogeneizar y conservar en freezer a -20°C.

Método 2: purificación de ADN con resina chelex-100® para muestras de exfoliación bucal

Esta técnica se basa en un trabajo previo de Walsh y colaboradores (2013) para técnicas forenses, y permite aislar ADN de muestras de exfoliación bucal, para lo cual un docente voluntario se hará un enjuague bucal con 1 ml de agua destilada o agua mineral, y luego de un buche enérgico lo recolectarán en un tubo de polipropileno de 15 ml.

- Centrifugar la muestra a 12.000 rpm durante 5 minutos con refrigeración. Descartar el sobrenadante.
- Agregar 200 ul de resina chelex-100® al 5% y resuspender con vórtex por 10 segundos.
- Transferir el material a un tubo tipo eppendorf.
- Incubar a 56°C por 30 minutos.
- Agitar por vórtex por 10 segundos.
- Hervir en baño maría por 10 minutos.
- Agitar por vórtex 10 segundos. Centrifugar a 4.000 rpm durante 1 minuto. La resina queda en el fondo y el ADN queda disuelto en el líquido sobrenadante.
- Al utilizar la muestra, tomar material del sobrenadante cuidando de no tomar resina al pipetear.
- Conservar en freezer a -20°C.

PCR

Como se expuso en el capítulo 5, la reacción en cadena de la polimerasa o PCR se basa en la síntesis repetida muchas veces de un fragmento de ADN, utilizando una ADN-polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, por ejemplo la enzima proveniente de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive a altas temperaturas (79°C a 85°C), conocida como “Taq polimerasa”. La reacción de PCR es una simulación *in vitro* de lo que sucede en una célula cuando se sintetiza el ADN, pero en este caso para una secuencia de ADN diana limitada por un par de oligonucleótidos iniciadores o cebadores, a partir de una muestra de ADN genómico. Dicha reacción se somete a ciclos de diferente temperatura donde se suceden tres etapas, desnaturalización, hibridación y extensión que se repiten sucesivamente, logrando la amplificación de la región de interés en las dos cadenas complementarias. Los productos generados aumentan su concentración de manera exponencial gracias a que cada nueva copia sirve de molde en el siguiente ciclo, dando origen a millones de copias (Figura 8.5).

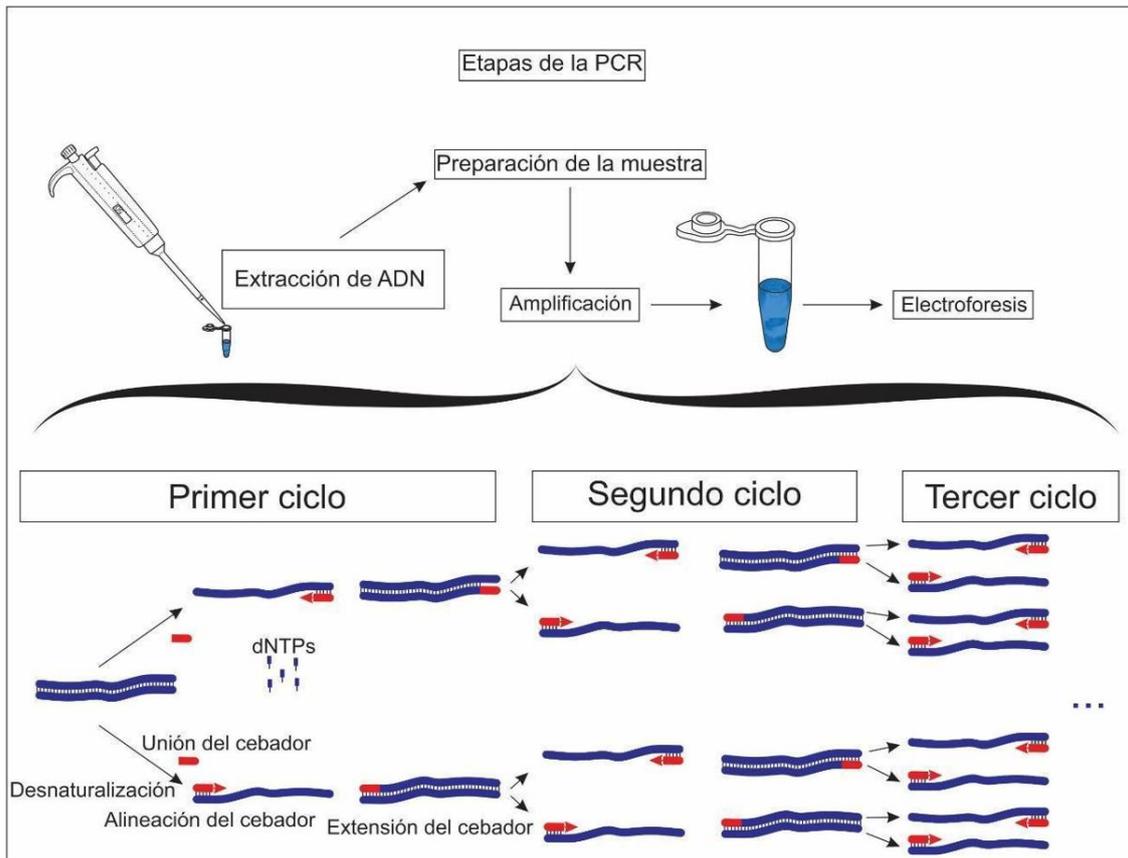


Figura 8.5. Etapas de la PCR.

La técnica de PCR tiene muchísimas aplicaciones, por ejemplo en genética de poblaciones, genética forense y medicina genómica, entre otras. Tiene como ventaja su alta sensibilidad, permitiendo la obtención de copias a partir de unas pocas moléculas originales presentes en una muestra. A su vez, esto presenta también una desventaja en cuanto al riesgo de contaminación con ADN proveniente de otras muestras, por lo cual es importante considerar ciertas recomendaciones. Es muy

importante separar el trabajo en áreas exclusivas pre-PCR (extracción de ADN y preparación de la reacción de PCR) y post-PCR (electroforesis) para evitar la contaminación del material a amplificar. Antes de comenzar, debe descontaminarse la mesada de trabajo (puede utilizarse hipoclorito de sodio 10% o radiación UV) a fin de eliminar cualquier fuente de ADN presente en el área, y es conveniente mantener separados los reactivos de las muestras de ADN durante la tarea. También es importante, como en toda tarea de laboratorio, controlar el correcto rotulado de los tubos y descartar adecuadamente los materiales de desecho. El uso de guantes descartables en la manipulación de los reactivos y las muestras es también esencial para evitar la acción de nucleasas presentes en el sudor u otros componentes que puedan afectar la reacción.

Como medida de control de posibles contaminaciones se recomienda incluir en cada ronda de PCR al menos un control negativo, el cual contendrá todos los reactivos menos el ADN molde, el cual se reemplazará por agua. Este tubo no debería desarrollar amplificación, por lo tanto si la hay, es indicativo de contaminación con alguna fuente de ADN indeseada. También suele ser conveniente incluir un control positivo, utilizando una muestra estandarizada que debe amplificar siempre que no haya problema con los reactivos.

Protocolo de amplificación

Se utilizarán 5 tubos, para 3 muestras de ADN, un control positivo y un control negativo. Para este último, se colocará agua ultrapura en reemplazo del volumen de ADN requerido. Son 5 tubos con 10ul finales cada uno = 50 ul.

Preparar una master-mix considerando el volumen final de 50ul totales.

Antes de iniciar la preparación, descongelar y agitar cada reactivo, y pasar por una minicentrífuga para evitar que quede el líquido en la tapa o las paredes del tubo. Mantener los reactivos en hielo para evitar la desfosforilación de los nucleótidos y la degradación de los cebadores y la polimerasa.

Tabla 8.3 Reactivos y concentraciones necesarios para una reacción de PCR estándar

Reactivo	Conc. Inicial	Conc. Final	Cantidad
H ₂ O	Csp 50ul		50-21,75=28,25*
Buffer de reacción	10X	1X	5ul
Cl ₂ Mg	25mM	2mM	4ul
dNTP	5mM	0,2mM	2ul
Oligonucleótidos	25pmol/ul	2,5ul /reacción	0,5ul
Taq pol	5 U/ul	0,25 U/reacción	0,25ul

* En la resta se incluye también el ADN que se colocará en cada tubo (total=20ul), aunque éste no se agregará hasta el final de la preparación.

Mezclar y centrifugar, repartir 8ul de mezcla en cada uno de los 5 tubos, rotular uno como control negativo, otro como control positivo y los otros 3 tubos con el código de cada muestra. Agregar el ADN (o el agua para el control negativo) y colocar una gota de aceite mineral para evitar la evaporación durante el ciclado.

ADN 10ng/ul20ng/reacción 2ul
 Aceite mineral *1 gota
 Centrifugar y llevar al termociclador (Tabla 8.4).

** Según el equipo termociclador utilizado, puede no requerirse el aceite mineral ya que los modelos más modernos presentan un bonete térmico que evita la evaporación, no haciendo necesario el agregado del aceite.

Tabla 8.4. Ejemplo de parámetros para un ciclado de PCR

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94°C	2'30''
Desnaturalización	93°C	0'45''
Hibridación de cebadores	45 a 70°C***	50''
Extensión	72°C	1'
Extensión final	72°C	5'

*** En función de la secuencia de los cebadores, se definirá la temperatura a utilizar.

Las etapas de Desnaturalización, Hibridación de cebadores y Extensión se repetirán un número determinado de veces.

Finalizada la reacción, chequear los amplicones mediante electroforesis en gel de agarosa, en una concentración acorde al tamaño del segmento a analizar.

Electroforesis

La electroforesis en gel es una técnica donde se hacen migrar a través de una matriz porosa las moléculas a estudiar, utilizando como fuerza de desplazamiento el impulso de un campo eléctrico de voltaje controlado. Se utiliza para separar macromoléculas, tales como proteínas y ácidos nucleicos, según su tamaño y su carga. En el caso de los ácidos nucleicos, la carga es siempre negativa, por lo cual la separación de moléculas dependerá solamente del tamaño de las hebras.

Para separar moléculas de ADN se utilizan tanto geles de agarosa (electroforesis horizontal) como de poliacrilamida (electroforesis vertical), dependiendo del nivel de resolución que se requiera, ya que los de agarosa permiten separar fragmentos de tamaños muy diferentes entre sí, mientras que los geles de poliacrilamida pueden separar fragmentos que se diferencian en unos pocos nucleótidos. Como compensación, los geles de agarosa tienen la ventaja de que son fáciles de utilizar y pueden guardarse para usarse más de una vez.

Los geles de agarosa se preparan a partir de un polímero lineal de galactosa y 3,6-anhidrogalaactosa que se funde con calor en un buffer de electroforesis, hasta obtener una solución homogénea. Ésta se vierte en un molde que contiene un peine, cuyos dientes van a generar los pocillos donde se sembrarán posteriormente las muestras de ADN (Figura 8.6). El gel ya frío queda con una consistencia similar a la gelatina, y su poder de resolución va a depender de la concentración de agarosa que se utilice, ya que la matriz del gel tendrá un tamaño de poro determinado según dicha concentración, cuando mayor sea ésta, los poros serán más pequeños.

El gel así preparado se introduce en una cuba de electroforesis (Figura 8.6) donde se conectan un electrodo positivo y uno negativo. Los pocillos del gel deben colocarse del lado negativo ya que, debido a su carga negativa, todas las moléculas de ADN migrarán hacia el polo contrario. En las dos cámaras de la cuba se agrega buffer de corrida, que debe ser el mismo que se utilizó para preparar el gel. Existen distintas alternativas, por ejemplo puede ser un buffer de tris-ácido acético-EDTA (TAE), o bien de tris-ácido bórico-EDTA (TBE).

Las muestras de ADN se siembran acompañadas de un buffer de carga que facilita el ingreso de las mismas en cada pocillo y la posterior visualización de un frente de corrida, gracias a un colorante que se incorpora con el buffer mencionado. Utilizando una micropipeta, se siembran las muestras en los respectivos pocillos y se enciende la fuente de voltaje. Las muestras pueden consistir en ADN genómico purificado, productos de PCR (llamados amplicones), o fragmentos de ADN digeridos con enzimas de restricción, entre otros. En uno de los pocillos debe sembrarse una muestra control con uno o más fragmentos de ADN de longitud conocida, a fin de tener una referencia de los tamaños en pares de bases de las muestras a correr. En la figura 8.7 se muestran dos marcadores, uno en la cuarta calle presenta bandas cada 50pb y el otro en la última calle, con bandas cada 100pb.

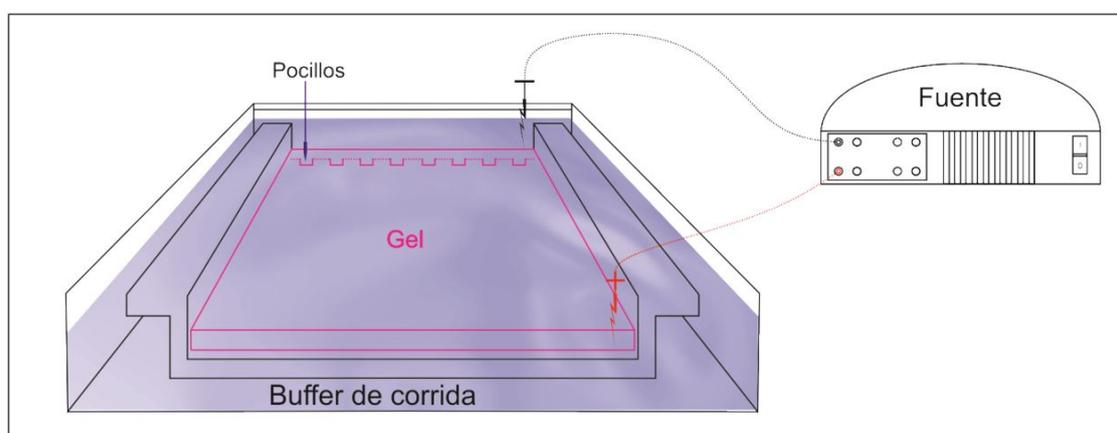


Figura 8.6. Esquema de una cuba de electroforesis horizontal para geles de agarosa.

En la corrida electroforética los fragmentos más cortos de ADN tendrán una mayor velocidad de migración a través de los poros del gel (Figura 8.7). Asimismo, la estructura de la doble hebra también tendrá un efecto en la capacidad de migración del ADN, ya que las moléculas circulares y las lineales migran de manera diferente.

Finalizada la corrida electroforética se procede a la visualización de los fragmentos, los cuales a simple vista no pueden observarse a menos que se realice una tinción de las moléculas de ADN con un agente intercalante, análogo de bases, fluorescente. Entre estos agentes, el bromuro de etidio está siendo menos utilizado debido a su potencial carcinogénico, y actualmente se tiende a reemplazarlo por agentes comerciales menos tóxicos (por ejemplo SybrGreen® o GelRed®, entre otros). Estas moléculas intercalantes en asociación con los fragmentos de ADN emiten fluorescencia al ser sometidas a la luz UV, permitiendo observar así los fragmentos que migraron a través del gel (Figura 8.7). Aquellos fragmentos que comparten el mismo tamaño en pares de bases, migrarán juntos en el gel formando una banda, la que se comparará con la muestra control de referencia para determinar su longitud en pares de bases (pb).

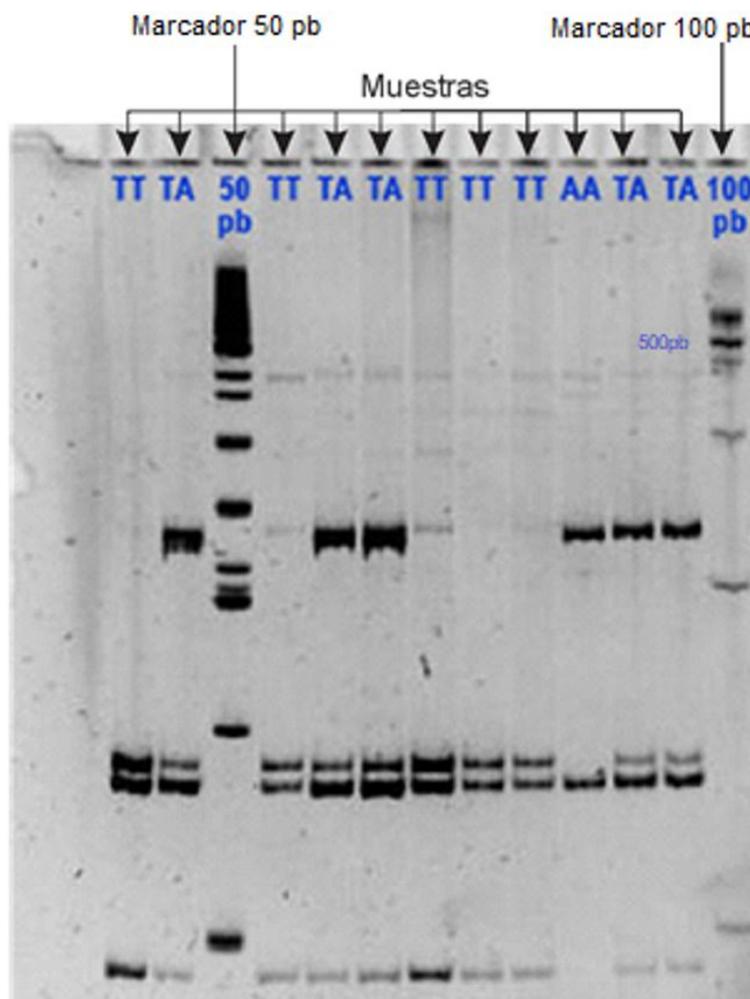


Figura 8.7. Corrida en gel de fragmentos de ADN digeridos con enzima de restricción, con 2 marcadores de tamaños (50 y 100 pares de bases). Las muestras tienen entre dos y cuatro fragmentos de diferente tamaño, dependiendo de las variantes alélicas que presenten.

Protocolo para electroforesis de ADN en gel de agarosa

Calentar y disolver agarosa en buffer TAE (tris-ácido acético-ácido bórico) y volcar en la base acrílica, luego de esperar que se enfríe levemente. Hay otras alternativas al buffer de preparación del gel y de la corrida en la cuba, pero ambos deben estar en coincidencia.

No olvidar colocar el peine antes de que la solución se haya solidificado. El ancho y profundidad de los dientes va a determinar la cantidad de muestra que pueda sembrarse en los pocillos.

Una vez gelificada la agarosa, quitar el peine, colocar el gel en la cuba electroforética y agregar buffer de corrida TAE en ambas cámaras de la cuba.

Preparar las muestras a sembrar con buffer de carga (azul de bromofenol+sacarosa) y agente de tinción (por ejemplo intercalante GelRed®).

Colocar las muestras en los pocillos.

Conectar los electrodos y definir los parámetros de la corrida electroforética en la fuente de voltaje.

Referencias

- Ashburner, M. (1898). *Drosophila: a laboratory handbook and manual*. Cold Spring Harbor laboratory Press, Nueva York.
- Base de Datos de Drosophila, FLYBASE: www.flybase.org
- Demerec, M. Ed. (1965). *Biology of Drosophila*. Editorial Hafner Publishing Co., Nueva York.
- Checa Rojas, A. (2017). *Método: Gel de electroforesis Agarosa. Conogasi, Conocimiento para la vida*. Fecha de consulta: Enero 18, 2020
- Espinosa, L. (2007) Guía práctica sobre la técnica de PCR 517 Guía práctica sobre la técnica de PCR. *Ecología Molecular*, 517–536.
- Gleason, J., Nuzhdin, S. & Ritchie, M. (2002). Quantitative trait loci affecting a courtship signal in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 89, 1–6. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800099>
- Guevara, Palmira, Riward Campelo Morillo, Richard Clack, Veronica Guariglia, Félix Moronta, and Kamran Rizzolo. (2009). *Manual de Laboratorio*. Editorial Universidad Central de Venezuela, Venezuela.
- Larrachea, E. (1997) Reaccion en cadena de la Polimerasa. *Revista Chilena de Neuro-Psiquiatria* 35, 247–249.
- Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H. F. R. N. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*, 16(3), 1215.
- Ramos Morales, P. *Manual de laboratorio de genética para Drosophila melanogaster*, McGraw-Hill Interamericana de México, 1993.
- Roberts, D. B. (1984). *Drosophila a practical approach*, IRL. Editorial Oxford Press, Oxford.
- Rocha-Salavarieta, P. J. (2002). “Teoría y Práctica Para La Extracción y Purificación Del ADN de Palma de Aceite.” *Revista Palmas* 23(3):9–17.

- Sambrook, Joseph, E. F. Fritsch, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2da Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Pres, Nueva York.
- Velázquez Alejos L. P., Aragón Martínez M. del C., Cornejo Romero A. (2008). Extracción y Purificación de ADN, en *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. SEMARNAT, México, pp. 1-26
- Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R. (2013, Reimpresión de 1991). Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *BioTechniques*, Vol. 54 No. 3: 134-139.

Glosario

Alelo: cada una de las diferentes formas en que puede presentarse un determinado gen.

Aneuploide: mutación cromosómica numérica que difiere del número de cromosomas de la especie, en uno o más cromosomas.

Autosoma: cualquier cromosoma no involucrado en la determinación del sexo.

Blastocisto: conjunto de células embrionarias en desarrollo que corresponden al segundo estadio temprano posterior a la fecundación.

Cariotipo: ordenamiento cromosómico de una especie expresado convencionalmente a partir de la observación de la metafase mitótica.

Células madre: células pluripotentes que poseen el potencial de convertirse en todos los tipos de células que necesite el organismo.

Corpúsculo de Barr: cromosoma X inactivo presente en los individuos del sexo homogamético XX, como proceso de compensación de dosis génica.

Cromátides hermanas: copias idénticas de ADN formadas luego de la fase S del ciclo celular, donde se replican semiconservativamente y se mantienen unidas mediante el centrómero.

Cromosomas homólogos: par cromosómico que poseen las células diploides. Cada uno procede de un progenitor.

Cruzamiento de prueba: cruzamiento entre un individuo de genotipo desconocido y un individuo de genotipo homocigota recesivo para analizar uno o más loci.

Diploide: células que poseen dos juegos de cromosomas (2n).

Electrofusión: fusión de células lograda por impulsos eléctricos que provocan pequeñas rupturas de la membrana plasmática, que posteriormente son reparadas.

Epistasis: la expresión de un gen se ve afectada por la expresión de otro gen u otros genes.

Euromatina: fracción de la cromatina que presenta bajo grado de compactación y es transcripcionalmente activa.

Eugenesia: mejoramiento de rasgos hereditarios en la población humana, a través de la aplicación de diversas técnicas. En los últimos años, el advenimiento de la manipulación genética (por ej. CRISPR-CAS) ha generado un resurgimiento de la discusión sobre este tema.

Euploide: mutación cromosómica numérica que afecta al complemento cromosómico completo, desde la presencia de una sola copia a la repetición "n" veces del mismo. Puede utilizarse como sinónimo de poliploidía.

Exón: región codificante de un gen.

Fenotipo: manifestación observable de un genotipo concreto, a veces en interacción con el ambiente.

Flybase.org: base de datos de *Drosophila melanogaster*.

Frecuencias alélicas: proporción con la que cada alelo aparece en una población.

Frecuencias fenotípicas: proporción de individuos que expresan una característica fenotípica.

Frecuencias genotípicas: proporción con la que cada genotipo aparece en la población.

Gen: unidad funcional de la herencia que transmite la información de una generación a otra.

GenBank: base de datos genéticos, perteneciente al National Institutes of Health de Estados Unidos (NIH). Los contenidos son accesibles de forma pública y gratuita a través de internet.

Genoma: material genético completo de la dotación cromosómica de un organismo.

Genotipo: composición alélica de los genes que posee un organismo.

Gigabase: longitud de una secuencia de ADN o ARN, en número de pares de bases. (1Gb = 1.000.000.000 Pb)

Haploide: células que poseen un único conjunto de cromosomas (n).

Hemicigosis: condición en la que se presenta solo un alelo y no el par, por ejemplo en el caso de los genes de la región propia del cromosoma X, en los machos de los mamíferos que solo poseen una copia de dicho cromosoma.

Heterocigota: que presenta dos alelos diferentes en un locus.

Heterocigosidad o heterocigosis: medida de la variabilidad presente en una población para un locus dado, dada por la relación de individuos heterocigotas respecto al total de individuos de esa población.

Heterocromatina: fracción de la cromatina que presenta alto grado de compactación y es transcripcionalmente inactiva.

Heterocromosoma: alosoma o cromosoma sexual. Difieren en forma y tamaño del resto de los cromosomas (autosomas). En aves, los cromosomas Z y W, y en mamíferos X e Y, determinan el sexo de los individuos.

Heterogamia: presentación diferencial de cromosomas en relación a la determinación sexual, por ejemplo los cromosomas X e Y en los mamíferos.

Híbrido: descendencia individual resultado del cruce entre organismos de distinto genotipo, por lo cual será portador de un genotipo heterocigota.

Homocigota: que presenta dos alelos iguales en un locus.

Idiograma: representación gráfica del complemento cromosómico haploide de una célula o una especie.

Intrón: regiones no codificantes de un gen que son eliminadas en el splicing, característico de organismos eucariotas, aunque puede hallarse en otros grupos como las arqueobacterias.

Kilobase: longitud de una secuencia de ADN o ARN, en número de pares de bases (1Kb = 1.000 pb).

Locus: posición que ocupa un gen dentro del cromosoma. Es invariable para una especie dada.

Loci: plural de locus.

Mutagénesis: método de estudio del daño sobre el material genético, producto de diversos agentes. Se aplica como estrategia para la identificación de genes que influyen sobre determinado fenotipo.

Nucleasa: enzima que catalizan la ruptura de los enlaces fosfodiéster.

Nucleosoma: estructura fundamental de la cromatina. Compuesta por 8 histonas y aproximadamente 146 pb que rodean al núcleo dos veces.

Portador sano: individuos que portan la copia alélica mutada y relacionada con una característica particular, pero que no la expresan. Refiere a organismos heterocigotas donde la copia analizada no se expresa en el fenotipo.

Promotor: secuencia de ADN que el aparato de transcripción reconoce y a la que se une. Indica cuál de las dos cadenas de ADN debe ser leída como molde y la dirección de la transcripción.

Recombinación: entrecruzamiento de las cromátides hermanas.

Replicación semiconservativa: modelo de replicación del ADN donde cada molécula nueva está conformada por una hebra original que actúa como molde para la copia de la hebra complementaria.

Retrocruza: cruzamiento de un organismo con uno de sus progenitores.

Solenioide: estructura cuaternaria del ADN, por enrollamiento de la cromatina al condensarse con seis nucleosomas por vuelta.

Varianza: medida de dispersión de los datos alrededor de un valor medio.

Los autores

Coordinadoras/Autoras

Catanesi, Cecilia I.

Licenciada en Biología (orientación Zoología) de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de La Plata y Doctora en Ciencias Naturales de la misma institución. Profesora de Genética de FCNyM/UNLP, a cargo de la Cátedra desde el año 2013. Investigadora Independiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Responsable del Laboratorio de Diversidad Genética del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE, CONICET-UNLP-CIC). Ha publicado 38 contribuciones incluyendo artículos científicos en revistas con referato y capítulos de libro. Actualmente dirige distintos proyectos enfocados en el estudio de la diversidad genética de la población argentina en relación con la identificación de personas y el diagnóstico genético.

Villegas Castagnasso, Egle

Licenciada en Ciencias Biológicas (Orientación Zoología) y Doctora en Ciencias Veterinarias de la FCNyM/ UNLP. Magister en Biología Molecular-Facultad Favaloro y Especialista en Educación Universitaria-UNLP. Profesora Adjunta de la cátedra de Genética FCNyM/UNLP y Jefe de Trabajos Prácticos de Genética General y Genética Forense de la FCV/UNLP. Profesional Principal de la Carrera de Personal de Apoyo en el Instituto de Genética Veterinaria "Ing. Fernando N Dulout" (IGEvet-UNLP-CONICET). Miembro del equipo de Genética de Animales Domésticos, corresponsable del área de secuenciación y microarray. Autora y coautora de trabajos científicos, capítulos de libros, presentaciones en congresos nacionales e internacionales, y miembro de proyectos científicos vinculados al uso de marcadores genéticos en el Área de Genética Animal.

Autores

Álvarez, María Fernanda

Licenciada en Biología (Orientación Zoología) de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo FCNyM/UNLP y Doctora en Biología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

(FCEyN/UNMdP). Ayudante Diplomada de la Cátedra de Genética y de Limnología de la FCNyM, UNLP. Investigadora Adjunta del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), cuyo tema de investigación son los efectos antrópicos y los controladores biológicos sobre la comunidad planctónica en ambientes someros de la cuenca del Río Salado. Coordinadora y/o Directora (en períodos alternos) del proyecto de Extensión Exploracuat@s desde el año 2015. Directora y participante de diversos proyectos de investigación; y autora de numerosas contribuciones científicas, de divulgación y de educación.

Anello, Melina

Licenciada en Biotecnología y Biología Molecular de la UNLP y doctora de Ciencias Exactas, Área Ciencias Biológicas/UNLP. Ayudante diplomada de la Cátedra de Genética en Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP durante 2014-2016 y continúa en la docencia como profesora de Química para 3ro y 4to año en Colegio Nacional, UNLP. Actualmente desarrolla un postdoctorado en el Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE) UNLP-CONICET-CICPBA, formando parte de diversos proyectos de investigación relacionados con la genética y la genómica de los camélidos sudamericanos. Entre los trabajos científicos en los que ha participado, destaca *“The ASIP gene in the llama (Lama glama): transcripts, expression and relation with color phenotypes”*, 2021 y *“The use of forensic DNA on the conservation of neotropical mammals”*, 2021.

Arnal, Nathalie

Licenciada en Biología (Orientación en Zoología) de la FCNyM (UNLP) y Doctora en Ciencias de la Salud en la Facultad de Cs Médicas de la UNLP. Es Ayudante de Primera en la Cátedra de Genética de la FCNyM/UNLP. Su trabajo de investigación se encuentra dentro del campo de las Neurociencias, investigando específicamente los efectos de los iones cobre en el metabolismo del colesterol y su posible relación con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Actualmente es Investigadora Adjunta del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Es miembro de la Sociedad Argentina en Neurociencias (SAN), autora de 16 publicaciones en revistas científicas internacionales y más de 20 comunicaciones en congresos nacionales e internacionales.

Barbisan, Gisela

Licenciada en Biología (Orientación en Zoología) FCNyM/UNLP y Doctora en Ciencias de la Salud de la FCM/UNLP. Jefa de Trabajos Prácticos en la Cátedra de Genética de la FCNyM/UNLP. Su trabajo de Tesis doctoral se basó en el análisis de Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNPs) en genes asociados a la infección por el virus del Papiloma humano (VPH) y la susceptibilidad al cáncer cervical. Actualmente es Profesional de Apoyo Principal del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Responsable de los STANs de Pirosecuenciación del IGEVET. Codirectora y docente en pasantías de grado y postgrado. Jurado de concursos y árbitro de revistas internacionales. Tuvo Participación en

más de 10 Proyectos de Investigación. Autora de más de 20 contribuciones científicas, incluidas publicaciones en revistas internacionales y comunicaciones en congresos.

Bolzán, Alejandro

Licenciado en Biología y Doctor en Ciencias Naturales por la Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Docente de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo (UNLP) desde 1986, ocupando actualmente el cargo de Profesor Adjunto Ordinario en la Cátedra de Evolución. Investigador Científico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, Argentina) desde 1998, desarrollando sus tareas en el Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE, La Plata) y ejerciendo el cargo de Jefe del Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis de dicho instituto desde el año 2006. Realiza tareas de investigación en el campo de la genética, especialmente en referencia al efecto tóxico de diversos compuestos antitumorales sobre el material genético de células animales y humanas, habiendo publicado a la fecha 60 trabajos científicos en revistas internacionales de la especialidad.

Crespi, Julián

Licenciado en Ciencias Biológicas (Orientación Zoología) de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata y Doctor en Ciencias Veterinarias, FCV/UNLP. Jefe de Trabajos Prácticos en la Cátedra de Genética General de la FCV/UNLP. Profesional Adjunto, Carrera de Personal de Apoyo en el Instituto de Genética Veterinaria "Ing. Fernando N Dulout" (IGEVET-UNLP-CONICET). Miembro del equipo de Genética de Animales Domésticos, responsable del área de diagnóstico de enfermedades genéticas en caninos y genotipado por microsatelites. Participa del Test de Comparación Internacional de la Sociedad Internacional de Genética Animal. Autor y coautor de numerosos artículos científicos, comunicaciones en eventos científicos tanto Nacionales como internacionales y miembro de proyectos científicos vinculados al Área de Genética Animal.

del Palacio, Alejandro

Licenciado en Biología (Orientación en Zoología) y Doctor en Ciencias Naturales en la FCNyM/UNLP. Ayudante de Primera en la Cátedra de Genética, FCNyM/UNLP y Jefe de Trabajos Prácticos en Ecología General (Departamento de Ambiente y Turismo-UNDAV). Su área de investigación se centra principalmente en la descripción y cuantificación de aspectos anatómicos de insectos del orden Odonata (libélulas), tanto de sus formas adultas como larvianas, incluyendo a su vez análisis biogeográficos y su utilización como bioindicadores de salud ambiental. Actualmente es Becario Posdoctoral del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Universidad Nacional de Avellaneda (UNDAV). Miembro de la Sociedad Argentina de Entomología (SEA) y miembro fundador de la Sociedad Odonatológica Latinoamericana (SOL). Autor de más de 30 contribuciones científicas, incluidas publicaciones en revistas internacionales y comunicaciones en congresos.

Ferrari, Héctor

Licenciado en Biología (Orientación Zoología) FCNyM, UNLP; Diplomado Superior en Enseñanza de las Ciencias, FLACSO; Magíster en Antropología por la Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Filosofía y Humanidades (FFyH,UNC); Doctor en Ciencias Naturales de la FCNyM-UNLP. Actualmente Profesor adjunto a cargo de las cátedras de Bienestar Animal (Fvet, UBA y de Etología FCNyM, UNLP y miembro del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Estudio (CICUAE), FCNyM, UNLP. Autor de más de 50 publicaciones científicas. Director del proyecto I+D"Complejidad social: estudios comparados en primates no humanos", como así también de otros proyectos científicos en el área.

González, Graciela

Licenciada en Biología (orientación Ecología) FCNyM-UNLP y Doctora de la Universidad de Buenos Aires (UBA) en el área de Ciencias Biológicas. Profesora Adjunta de la cátedra Introducción a la Botánica (FCNyM-UNLP). Investigadora Independiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) en el Laboratorio de Citogenética y Evolución (LaCyE) del Instituto de Ecología, Genética y Evolución de Buenos Aires y la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA (IEGEB-CONICET, FCEyN-UBA). Trabaja en Citogenética Vegetal, empleando métodos clásicos y moleculares en el análisis evolutivo, sistemático y de caracterización cariotípica del maíz y sus especies silvestres relacionadas, así como también de pasturas y plantas ornamentales. Posee 40 publicaciones en revistas nacionales e internacionales y 65 comunicaciones en congresos y reuniones científicas.

González García, Lucas

Licenciado en Biología (Orientación Zoología) FCNyM/UNLP. Docente Ayudante Alumno de la Cátedra de Genética de la FCNyM (2016 - 2019). Docente Ayudante Alumno en el Curso Introductorio de la FCNyM (2017). Actualmente forma parte del Laboratorio de Investigación de Hormigas LIHo en San Carlos de Bariloche. Estudiante de la carrera de Doctorado en Biología en el proyecto titulado: "Control biológico de plagas mediado por artrópodos en huertas familiares de la Patagonia Argentina; contexto espacial y temporal de las interacciones depredador-presa y parasitoide-hospedador", en INIBIOMA-CONICET. Coautor de dos artículos sobre ornitología; el primero en 2020 en la revista El hornero y el restante en la revista Forest Ecology and Management junto a integrantes de la Sección Ornitología, División Zoología Vertebrados del Museo de la Plata.

Hohl, Diana

Licenciada en Biotecnología y Biología Molecular FCEx,/UNLP. Se desempeñó como Ayudante Alumna en las Cátedras de Biología (CiBEx) e Introducción a la Química para CNYM/UNLP. Estudiante del Doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas, área Ciencias Biológicas (UNLP) y becaria del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Desarrolla su trabajo de investigación en el Laboratorio de Diversidad Genética del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE), sobre la genética del color del iris en la población bonae-

rense y la utilidad de sistemas de predicción del fenotipo a partir del genotipo para uso forense. Autora de más de 20 contribuciones científicas, incluidas publicaciones en revistas internacionales y comunicaciones en congresos y jornadas.

Mantella, Melisa

Licenciada en Antropología por la Facultad de Ciencias Naturales y Museo/UNLP. Ayudante alumna Ad honorem de la Cátedra de Genética de FCNyM/UNLP, entre los años 2018 y 2020. Actualmente docente de Nivel Medio en Colegio Secundario Río de La Plata Sur. Colaboradora en proyectos de investigación en el Instituto de Genética Veterinaria (IGEVEVET), analizando los efectos de la dieta y las deficiencias minerales sobre la inducción de inestabilidad genética. Participante del proyecto de extensión, PROCOPIN- La Comunidad y la Universidad en el control de las Parasitosis Intestinales y el mejoramiento de la Nutrición, FCM/UNLP, durante el año 2013. Autora y coautora de publicaciones científicas y comunicaciones en congresos en el área de la Antropología Biológica y Genética.

Mira, Anabela

Licenciada en Genética de la Universidad Nacional de Misiones y Doctora de la Universidad de Buenos Aires. Ayudante de Primera en la Cátedra de Genética de la FCNyM/UNLP. Autora de 9 contribuciones científicas originales en revistas internacionales, resultantes de su trabajo de doctorado y 2 postdoctorados consecutivos. Actualmente es asistente de Investigación y Desarrollo en Bioinnovo. Su trabajo de investigación se desarrolla en el campo de la sanidad animal, con especialidad en producción de proteínas en sistema baculovirus recombinante y formulación de vacunas experimentales de uso veterinario. Su área de investigación incluye el procesamiento, purificación y caracterización de proteínas a escala piloto.

Nikoloff, Noelia

Licenciada en Biología (Orientación Zoología) y Doctora en Ciencias Naturales FCNyM/UNLP. Ayudante diplomado de la cátedra de Genética de la FCNyM-UNLP. Investigadora Adjunta CONICET en el Instituto de Genética Veterinaria "Ing. Fernando N Dulout" (IGEVEVET-UNLP-CONICET), línea de trabajo es la detección temprana de daño genotóxico, citotóxico y fisiológico en gametas y embriones de mamífero inducidos por fármacos de uso veterinario, así como también el desarrollo de métodos alternativos in vitro al uso de animales en la evaluación de riesgo de productos en el área reproductiva. Ha publicado 30 trabajos en revistas de alto impacto y 64 trabajos en Reuniones Científicas Nacionales e Internacionales. Dirige y ha participado en más de 15 proyectos de I+D y Extensión financiados por la UNLP, CONICET y Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la República Argentina.

Posik, Diego

Licenciado en Biología (orientación Zoología) FCNyM (UNLP) y Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas FCEX (UNLP). Profesor Adjunto de Biología (FCEX,UNLP) y Genética Veterinaria

Forense (FCV, UNLP). Profesional Principal, Carrera de Personal de Apoyo del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) del Instituto de Genética Veterinaria (IGEVET)/UNLP- CONICET. Miembro del equipo de Genética de Animales Domésticos, corresponsable del área de secuenciación y microarray, desarrollo laboral en el área determinación de composición de alimentos.

Ruiz de Arcaute, Celeste

Licenciada en Biología (Orientación en Ecología) y Doctora en Ciencias Naturales en la FCNyM/UNLP. Ayudante de Primera en la Cátedra de Genética y en la Cátedra de Citología de la FCNyM/UNLP. Su trabajo de investigación se encuentra dentro del campo de la sanidad ambiental, con especialidad en Ecotoxicología y Genética Toxicológica. Actualmente es Becaria Posdoctoral del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Miembro de la Sociedad Argentina de Toxicología (ATA) y la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC). Autora de más de 50 contribuciones científicas, incluidas publicaciones en revistas internacionales y comunicaciones en congresos. Su área de investigación incluye la evaluación de toxicidad, genotoxicidad, daño y estrés oxidativo inducido por pesticidas o mezclas de estos en organismos acuáticos.

Steinberg, Eliana

Licenciada en Ciencias Biológicas (UBA) y Doctora de la Universidad de Buenos Aires (UBA) en el área de Ciencias Biológicas. Se desempeña como Ayudante de Primera en la materia “Citogenética” de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN) de la UBA. Actualmente es Investigadora Asistente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y trabaja en el Grupo de Investigación en Biología Evolutiva (GIBE/FCEyN/UBA). Es autora de más de 80 contribuciones científicas, incluidas publicaciones en revistas internacionales, capítulos de libros y comunicaciones en congresos nacionales e internacionales. Su área de investigación comprende el estudio de la Genética Evolutiva y Sistemática en Primates Neotropicales, con énfasis en los mecanismos de evolución cromosómica y la diversidad de sistemas cromosómicos de determinación del sexo.

Villaverde, María Luciana

Licenciada en Biología (Orientación en Zoología) y Doctora en Ciencias Naturales en la FCNyM/UNLP. Ayudante de Primera en la Cátedra de Genética de la FCNyM/UNLP. Su trabajo de doctorado fue realizado sobre lípidos y feromonas en plagas de granos almacenados, con especialidad en bioquímica cuticular y secreciones volátiles. Autora de más de 30 contribuciones científicas, incluidas publicaciones en revistas internacionales, comunicaciones en congresos y participación en proyectos de investigación. Su área de investigación incluyó la evaluación de feromonas liberadas por insectos plaga, su composición bioquímica y su aplicación en el control de plagas.

Elementos de genética : para estudiantes de Ciencias Biológicas / Cecilia I. Catanesi ... [et al.] ; coordinación general de Cecilia I. Catanesi ; Egle E. Villegas Castagnasso ; ilustrado por Alejandro del Palacio.- 1a ed.- La Plata : Universidad Nacional de La Plata ; La Plata : EDULP, 2021.
Libro digital, PDF - (Libros de cátedra)

Archivo Digital: descarga
ISBN 978-950-34-2061-4

1. Genética. 2. Biología Molecular. 3. Bioética. I. Catanesi, Cecilia I., coord. II. Villegas Castagnasso, Egle E., coord. III. Palacio, Alejandro del, ilus.
CDD 576.5

Diseño de tapa: Dirección de Comunicación Visual de la UNLP

Universidad Nacional de La Plata – Editorial de la Universidad de La Plata
48 N.º 551-599 / La Plata B1900AMX / Buenos Aires, Argentina
+54 221 644 7150
edulp.editorial@gmail.com
www.editorial.unlp.edu.ar

Edulp integra la Red de Editoriales Universitarias Nacionales (REUN)

Primera edición, 2021
ISBN 978-950-34-2061-4
© 2021 - Edulp

n
naturales


Edulp
EDITORIAL DE LA UNLP



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA